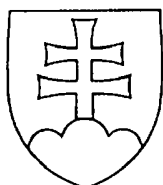


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **6. 7. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **11/192270**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **6. 7. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **JP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 6. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/JP00/04523**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/02012**

(11), (21) Číslo dokumentu:

16-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**A61K 45/00,
A61K 39/395,
A61P 3/14,
A61P 5/18**

(71) Prihlasovateľ: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, Kita-ku, Tokyo, JP;**

(72) Pôvodca: **Saito Hidemi, Gotenba-shi, Shizuoka, JP;
Tsunenari Toshiaki, Gotenba-shi, Shizuoka, JP;
Onuma Etsuro, Gotenba-shi, Shizuoka, JP;**

(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Terapeutické činidlo na hyperkalcinémiu**

(57) Anotácia:
Je opísané terapeutické činidlo na hyperkalcinémiu, ktorá je odolná proti liekom, pričom obsahuje ako svoju aktívnu zložku látku schopnú inhibovať väzbu medzi proteínom podobným hormónu prištítnych teliesok (PTHrP) a jeho receptorom.

Terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka terapeutického činidla pre hyperkalcinémiu, ktorá je odolná voči liekom, ktoré ako svoju aktívnu zložku obsahujú látku schopnú inhibovať väzbu medzi proteínom podobným hormónu prištítnych teliesok (PTHrP) a receptorom.

Doterajší stav techniky

Pri liekovej terapii (teda farmakoterapii) humorálnej hyperkalcémie zhubného bujnenia (HHM), je podávaná doplňujúca infúzia močopudného činidla alebo činidla potlačujúceho vstrebávanie kostnej drene (napríklad bifosfonát alebo kalcitonín). Súčasným trendom v liekovej terapii je podávanie kalcitonínu alebo bifosfonátu samotného alebo kombináciu kalcitonínu s bifosfonátom.

Podávanie kalcitonínu má veľmi rýchly nástup pôsobenia a terapeutický účinok trvá niekoľko hodín po podaní. Kalcitonín je primárne účinný kvôli svojmu inhibičnému pôsobeniu na vstrebávanie kostnej drene. Pri aplikovaní môže byť kalcitonín pacientovi podávaný injekčne vnútro svalovo alebo vnútrožilovo dvakrát denne (ráno a večer), pričom dávka obsahuje 40 až 80 jednotiek.

Bifosfonát je zlúčenina, ktorá je účinná pre svoje veľmi silné inhibičné pôsobenie na vstrebávanie kostnej drene. Má pomalý nástup pôsobenia, ktorý vyžaduje tri až štyri dni, než je terapeutický účinok plne vyjadrený. Potom je tiež používaná kombináčna terapia, skladajúca sa z kalcitonínu a bifosfonátu (ktorý nepôsobí rýchlo, ale veľmi silne inhibične pôsobí na vstrebávanie kostnej drene).

Bohužiaľ bifosfonát a kalcitonín môže mať pri používaní nasledujúce obmedzenia.

(1) Bifosfonát:

- Napriek tomu, že môže inhibovať vstrebávanie kostnej drene, nemôže

zlepšiť vylučovanie vápnika ľadvinami.

- Má pomalý nástup pôsobenia, ktorý vyžaduje tri až štyri dni, ako je terapeutický účinok vyjadrený.
- Je nedostatočne účinný u pacientov s vysokými krvnými hladinami PTHrP (12 pmol/l alebo vyššie) a má kratší čas pôsobenia.
- Jeho pôsobenie sa oslabuje, keď je podávaný opakované. Pri opakovanom podávaní je potom požadované, aby bol podávaný v intervaloch aspoň jedného týždňa, aby došlo k udržaniu odpovede, indukovanej počiatočným podaním.
- Môže niekedy spôsobiť hypokaicinémiu.

(2) Kalcitonín:

Jeho účinok na zníženie hladín vápnika dosahuje maximum v rozmedzí medzi 12 až 24 hodinami po podaní. Keď je potom vykonané opakované podanie, môže však účinok vykázať opätovný vzostup v rozmedzí medzi 4 až 5 dní po podaní, čo je známo ako tzv. „únikový efekt“.

Z vyššie vyložených dôvodov sú tieto lieky v svojom klinickom pôsobení obmedzené z dôvodu zníženej účinnosti, spôsobenej opakovaným podávaním alebo vývojom odolnosti k liekom. Navyše tieto lieky nie sú uspokojivé pre zlepšenie stavu pacientov QOL a pacientov HHM.

Podstata vynálezu

Predmetom predloženého vynálezu je poskytnúť liečebné činidlo pre hyperkalcinémiu, ktoré je odolné k lieku, ktoré ako svoju aktívnu zložku obsahuje látku schopnú inhibovať väzbu medzi proteínom podobným hormónu prištítnych teliesok (PTHrP) a jeho receptorom.

Autori predloženého vynálezu vykonali extenzívnu a intenzívnu štúdiu ako prekonať vyššie uvedené nedostatky. Výsledkom bolo zistenie, že látka schopná inhibovať väzbu medzi PTHrP a jeho receptorom môže zlepšiť hyperkalcinémiu, ktorá je odolná k existujúcemu terapeutickému činidlu pre hyperkalcinémiu, ako sú činidlá inhibujúce vstrebávanie kostnej drene. Toto zistenie viedlo k vykonaniu vynálezu.

Preto predložený vynález poskytuje terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu, ktoré je odolné k liekom, ktoré ako svoju aktívnu zložku obsahujú látku schopnú inhibovať väzbu medzi PTHrP a jeho receptorom. V tomto ohľade hyperkalcinémia, ktorá je odolná k liekom, môže byť odolná k terapeutickému činidlu pre hyperkalcinémiu inému, než je zlúčenina schopná inhibovať väzbu medzi PTHrP a jeho receptorom. Látka môže byť antagonist PTHrP receptoru, protilátka proti PTHrP, ktorá môže byť monoklonálneho alebo polyklonálneho typu, s výhodou typu monoklonálneho. Monoklonálna protilátka môže byť zušľachtená protilátka, chimérna protilátka, alebo fragment protilátky a/alebo modifikovaná forma fragmentu. Zušľachtenou protilátkou môže byť zušľachtená protilátka #23-57-137-1. Hyperkalcinémia, ktorá je odolná k liekom, môže byť spôsobená rakovinou.

Termín „liek“ v prípade „hyperkalcinémia, ktorá je odolná k liekom“ tu označuje akýkoľvek liek alebo činidlo, pokiaľ je terapeuticky účinný na hyperkalcinémiu, ako je činidlo inhibujúce vstrebávanie kostnej drene, činidlo podporujúce vylučovanie vápnika, činidlo inhibujúce gastrointestinálne vstrebávanie vápnika a močopudné činidlo.

Termín „hyperkalcinémia, ktorá je odolná k liekom“ tu označuje triedu hyperkalcinémie, ktorá vykazuje odolnosť k lieku, ktorý má terapeutický účinok na hyperkalcinémiu, keď je liek podávaný opakovane, ako je napr. hyperkalcinémia, ktorá je odolná k činidlu inhibujúcemu vstrebávaniu kostnej drene, činidlu podporujúcemu vylučovanie vápnika, činidlu inhibujúcemu gastrointestinálne vstrebávanie vápnika a močopudnému činidlu, najlepšie činidlu inhibujúcemu vstrebávaniu kostnej drene.

Činidlo inhibujúce vstrebávanie kostnej drene môže obsahovať bifosfonát, kalcitonín atď.

Bifosfonát môže obsahovať napríklad alendronát, pamidronát a incadronát.
Kalcitonín môže obsahovať napríklad kalcitonín, elcatonín a lososí kalcitonín.

Činidlo podporujúce vylučovanie vápnika môže obsahovať kalcitonín a močopudné činidlo.

Činidlo inhibujúce gastrointestinálne vstrebávanie vápnika môže obsahovať glukokortikoid a anorganický fosfát.

Močopudné činidlo môže obsahovať furosemid.

Činidlo inhibujúce osteoklast môže obsahovať protirakovinové činidlo, ako je aktinomycín D, cisplatín a mitramycín.

Ďalej bude predložený vynález popísaný podrobne.

Tento popis zahrňuje časti alebo celé obsahy, ktoré sú popísané v popise a/alebo obrázkoch japonskej patentovej prihlášky č. 11-192 270, čo je dokument, ktorý má vzhľadom k predkladanej prihláške prednostné právo.

Predložený vynález sa týka terapeutického činidla pre hyperkalcinémiu, ktorá je odolná k lieku, ktorý ako svoju aktívnu zložku obsahuje látku schopnú inhibovať väzbu medzi proteínom, podobajúcim sa hormónu prítitných teliesok (tu je označovaný ako „PTHrP“) a jeho receptorom (tu je označovaný ako „PTHrP receptor“).

Termín „PTHrP receptor“ tu označuje akýkoľvek receptor, ktorý sa môže viazať k PTHrP (ako sú tie, ktoré sú popísané v publikácii č. 6-506 598, predložené pre japonskú národnú fázu preskúmania), bez ohľadu na to, či PTHrP receptor je alebo nie je na cieľovom orgáne prítomný (napríklad kosť, l'advina).

Termín „látka schopná inhibovať väzbu medzi PTHrP a jeho receptorom (PTHrP receptor)\", tu označuje akúkoľvek látku, ktorá sa môže viazať na PTHrP a zabrániť tak väzbe PTHrP na PTHrP receptor, ako je protilátka proti PTHrP; akúkoľvek látku, ktorá sa môže viazať na PTHrP receptor a zabrániť tak väzbe PTHrP receptoru k PTHrP, ako je antagonista k PTHrP receptoru (PTHrP antagonista), špecifický peptid, ktorý obsahuje zámenu alebo deléciu aspoň jedného aminokyselinového zvyšku v PTHrP peptidu alebo obsahuje čiastočnú sekvenciu PTHrP peptidu; alebo ich kombinácie.

Protilátka proti PTHrP zahŕňa protilátky akýchkoľvek známych typov, ako sú zušľachtené protilátky, ľudské protilátky (WO 96/33 735) alebo chimérna protilátka (japonská patentová prihláška č. 4-228 089), a protilátku produkovanú hybridomom #23-57-137-1 (teda protilátka 23-57-137-1). Protilátka môže byť polyklonálneho typu alebo monoklonálneho typu, výhodný je ale typ monoklonálny. Antagonista PTHrP zahŕňa mimo iných polypeptid alebo látku s nízkou molekulovou hmotnosťou. Príkladom antagonistu PTHrP je látka, ktorá sa viaže na PTHrP receptor antagonistickým spôsobom proti PTHrP, ako je PTHrP (7-34), PTHrP (8-34), PTHrP (9-34), PTHrP (10-34), alebo jeho mutácie, ktorá obsahuje zámenu, deléciu alebo adíciu aspoň jedného aminokyselinového zvyšku. Ich ďalšie príklady obsahujú polypeptidy, ktoré majú antagonistickú aktivitu proti PTHrP, ako je popísané v japonskej patentovej prihláške č. 7-165 790; v publikácii č. 5-509 098, predložené pre japonskú národnú fázu preskúmania; Peptides (Spojené štáty), 1995, 16(6) 1031-1037; a Biochemistry (Spojené štáty), apríl 281 992, 31(16) 1026-4033. Tieto polypeptidy môžu mať deléciu, zámenu, adíciu alebo inzerciu aspoň jedného aminokyselinového zvyšku, pokiaľ môžu mať ekvivalentnú úroveň PTHrP antagonistickej aktivity, tieto sú tiež zahrnuté medzi PTHrP antagonisty, ktoré sú predmetom tohoto vynálezu.

V predložennom vynáleze bude ďalej ako príklad „látky schopnej inhibovať väzbu medzi PTHrP a PTHrP receptorom" popísaná protilátka proti PTHrP.

1. Protilátka proti PTHrP

Protilátka proti PTHrP, použitá v predložennom vynáleze, môže byť akákoľvek

protilátka, ktorá môže vykázať terapeutický účinok na hyperkalcinémiu, ktorá je odolná k liekom, bez ohľadu na jej zdroj, typ (monoklonálny alebo polyklonálny) a konfiguráciu.

Protilátka proti PTHrP, použitá v predloženom vynáleze, môže byť produkovaná pomocou akéhokoľvek známeho postupu ako polyklonálna protilátka alebo monoklonálna protilátka. Je výhodné, keď protilátka proti PTHrP je monoklonálna protilátka, odvodená z cicavca. Z cicavcov odvodené monoklonálne protilátky obsahujú protilátky vytvárané v hybridomoch a protilátky, vytvárané pomocou geneticko-inžinierskych postupov v hostiteľovi, transformovanom pomocou rekombinantného expresného vektoru, ktorý nesie gén pre protilátku. Protilátka sa môže viazať na PTHrP a zabráňovať väzbe PTHrP na PTH/PTHrP receptor, čím dochádza k blokovaniu prenosu signálu PTHrP a následkom toho k potlačeniu biologickej aktivity PTHrP.

Špecifickým príkladom takejto protilátky je protilátka #23-57-137-1, ktorá môže byť vytváraná hybridomovým klonom #23-57-137-1.

Hybridomový klon #23-57-137-1 bol označený „hybridom myš - myš #23-57-137-1“ a uložený za podmienok budapeštianskej zmluvy 15. augusta 1996 v Národnom ústave biologických vied a ľudskej technológie, Agentúra priemyslovej vedy a technológie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod prístupovým číslom FERMBP-5631.

2. Hybridom produkujúca protilátka

Hybridom produkujúca monoklonálna protilátka môže byť vytvorená nasledujúcim spôsobom. PTHrP je použitý ako antigén pre imunizáciu podľa bežného imunizačného postupu. Výsledné imunocyty sú fúzované so známymi rodičovskými bunkami pomocou bežných postupov pre fúziu buniek, a bunky produkujúce monoklonálnu protilátku sú z fúzovaných buniek vytriedené pomocou bežnej triediacej metódy.

Po prvé, ľudský PTHrP, ktorý je použitý ako senzibilizujúci antigén pre

vytváranie protilátky, je pripravený pomocou exprimovania PTHrP génu/aminokyselinovej sekvencie popísanej v Sůva, L. J. a kol., Science (1987)237, 893. Nukleotidová sekvencia kódujúca PTHrP je vložená do známeho expresného vektoru, a s týmto expresným vektorom je transformovaná vhodná hostiteľská bunka. PTHrP proteín je potom z transformovanej hostiteľskej bunky alebo zo supernatantu bunkovej kultúry izolovaný a purifikovaný pomocou akejkoľvek známej metódy.

Potom je purifikovaný PTHrP proteín použitý ako senzibilizujúci antigén. Inou možnosťou je, že ako senzibilizujúci antigén môže byť použitý chemicky syntetizovaný peptid, skladajúci sa z 34 aminokyselín, ktorý tvorí N-koncovú oblasť PTHrP.

Druh cicavca, ktorý bude imunizovaný senzibilizujúcim antigénom, nie je zvlášť obmedzený. Avšak tento cicavec je s výhodou vyberaný so zreteľom na zlučiteľnosť s bunkami, ktoré sú použité pre bunkovú fúziu. Všeobecne môže byť použitý hlodavec (napríklad myš, krysa, škrečok), králik alebo opica.

Imunizácia cicavca senzibilizujúcim antigénom môže byť vykonaná podľa akéhokoľvek známeho postupu, napríklad injekčným podaním senzibilizujúceho antigénu cicavcovi intraperitoneálne alebo podkožne. Podrobnejšie povedané, senzibilizujúci antigén je vhodne rozriedený alebo suspendovaný do fyziologického roztoku pufovaného fosforečnanom (PBS) alebo do fyziologického roztoku, výsledné riedenie alebo suspenzia je zmiešaná s vhodným množstvom bežného adjuvans (napríklad Freudovo kompletné adjuvans), aby bola dosiahnutá emulzia. Emulzia je cicavcovi podaná injekčne niekoľkokrát v intervaloch 4 až 21 dní. Pre imunizáciu môže byť senzibilizujúci antigén pripojený k vhodnému nosiču.

Po imunizácii je kontrolovaná hladina protilátky v séru. Keď je potvrdené, že hladina protilátky v sére dosiahla požadovanej úrovne, sú tu cicavce izolované imunocyty a je s nimi vykonaná bunková fúzia. Výhodným imunocytom je slezinná bunka.

Rodičovská bunka použitá pre bunkovú fúziu (teda bunka slúžiaca ako protiklad pri bunkovej fúzii s imunocytom) je myelomová bunka odvodená z cicavca.

Myelomová bunka je z akejkoľvek známej bunkovej línie, napríklad P3 (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), 8194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) alebo R210 (Galfre, G. a kol., Nature (1979) 277, 131-133).

Bunková fúzia imunocyty s myelomovou bunkou je v podstate vykonaná podľa akejkoľvek známej metódy, ako je napríklad metóda podľa Milstein a kol., (Kohler, G. a Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

Presnejšie povedané, bunková fúzia je vykonaná napríklad vo vhodnom živnom médiu pre bunkové kultúry, v prítomnosti činidla podporujúceho bunkovú fúziu. Činidlo podporujúce bunkovú fúziu môže byť polyetylén glykol (PEG) alebo vírus Sendai (hemaglutinujúci japonský vírus; HVJ). Pokiaľ je to žiadúce, za účelom vylepšenia účinnosti fúzie môže byť použité prísad, ako je dimetylsulfoxid.

Pomer medzi imunocyty a myelomovými bunkami pri bunkovej fúzii môže byť akýkoľvek. Napríklad imunocyty sú použité v množstve 1 až 10krát väčšom než bunky myelomové. Médium pre bunkové kultúry, použité pre bunkovú fúziu, je napríklad médium RPMI 1640 alebo médium MÉM, vhodné pre rast vyššie uvedených myelomových bunkových línií, alebo iné médium, bežne používané pre kultiváciu takých bunkových línií. Pokiaľ je to žiadúce, môže byť do kultivačného média pridaný doplnok séra, ako je napríklad fetálne tel'acie sérum (FCS).

Bunková fúzia je vykonaná dokonalým premiešaním daných množstiev imunocytov a myelomových buniek v kultivačnom médiu, k zmesi je pridaný roztok PEG (napríklad s priemernou molekulovou hmotnosťou 1000 až 6000) (ktorý bol napred ohriaty na asi 37 °C) obvykle do 30 až 60% koncentrácie (hmotnosť/objem), a potom miešaním výsledného roztoku, čím vznikajú požadované fúzne bunky (teda hybridomy). Potom je postupne k kultivačnému roztoku pridané vhodné kultivačné médium a je vykonaná centrifugácia, aby bol odstránený supernatant. Tento postup je niekoľkokrát opakovaný, aby bolo z kultivačného média odstránené činidlo

podporujúce bunkovú fúziu alebo iné látky, ktoré nie sú pre rast hybridomov žiadúce.

Získané hybridomy môžu byť selektované pestovaním v bežnom selekčnom médiu, ako je médium hypoxantín-aminopterín-tymidín (HAT). Kultivovanie hybridomov v HAT médiu sa vykonáva v časovom období postačujúcom k tomu, aby zahynuli všetky bunky okrem požadovaných hybridomov (teda bunky ktoré nefúzovali), bežne sa jedná o niekoľko dní až niekoľko týždňov. Potom je vykonaná bežná metóda koncového riedenia, aby boli vybrané jednotlivé klony hybridomov, ktoré vylučujú požadovanú protilátku.

Ako inú metódu, než je vyššie popísaná metóda prípravy hybridomov pomocou imunizácie cicavca, iného než človeka, antigénom, je tá, keď ľudské lymfocyty môžu byť senzitizedované PTHrP *in vitro* a potom je s týmito senzitizedovanými lymfocytmi vykonaná bunková fúzia s ľudskými myelomovými bunkami, ktoré sú schopné nekonečného rastu, a tak je produkovaná ľudská protilátka s väzobnou schopnosťou k PTHrP (japonský patent 1-598 878). Iným spôsobom môže byť ľudská protilátka proti PTHrP pripravená pomocou injekčného podania PTHrP ako antigénu transgénnemu zvieraťu, ktoré má úplný repertoár ľudských protilátkových génov, aby vytvorilo bunky produkujúce protilátku proti PTHrP, potom je vykonaná imortalizácia týchto buniek, čím je dosiahnuté produkovanie ľudskej protilátky v imortalizovaných bunkách (medzinárodné patenty WO 94/25 585, WO 93/12 227, WO 92/03 918 a WO 94/02 602).

Hybridomy produkujúce monoklonálnu protilátku, pripravené ako bolo popísané vyššie, môžu byť pestované v bežnom kultivačnom médiu a uložené v tekutom dusíku v dlhom časovom období.

Pre produkciu monoklonálnej protilátky z hybridomu môže byť použitá metóda, ktorá sa skladá z kultivovania hybridomu pomocou bežnej techniky a odoberania monoklonálnej protilátky zo supernatantu bunkovej kultúry, alebo metóda, ktorá sa skladá z injekčného podania hybridomu cicavcovi, ktorý je s hybridomom zlučiteľný, aby došlo k rastu hybridomu v cicavcovi a monoklonálna protilátka je odoberaná z ascitov tohoto cicavca. Prvá metóda je vhodná pre produkciu protilátky s vysokou čistotou, zatiaľ čo druhá metóda je vhodná na produkciu protilátky vo vysokom

množstve.

3. Rekombinantná protilátka

V predloženom vynáleze môže byť použitý rekombinantný typ protilátky, ktorý môže byť vytvorený pomocou klonovania protilátkového génu z hybridomu, vložení protilátkového génu do vhodného vektora, vnesení vektoru do hostiteľa a potom produkovaním protilátky z hostiteľa, všetko pomocou bežnej rekombinačnej génetickej techniky (viď. napríklad Vandamme, A. M. a kol., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775).

Presnejšie povedané, mRNA kódujúca variabilnú (V) oblasť protilátky proti PTHrP je izolovaná z hybridomu produkujúceho protilátku proti PTHrP. Izolácia mRNA je vykonaná tak, že je pomocou akejkoľvek známej metódy, ako je napríklad ultracentrifugačná metóda s guanidínom (Chirgwin, J. M. a kol., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) a AGPC metóda (Chomczynski, P. a kol., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) pripravená celková RNA, a potom je z tejto celkovej RNA získaná požadovaná mRNA pomocou súpravy pre purifikáciu mRNA (Pharmacia), alebo inej podobnej. Inou možnosťou je to, že mRNA môže byť tiež pripravená priamo za použitia súpravy QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

Ďalej je z mRNA pomocou reverznej transkriptázy syntetizovaná cDNA pre V oblasť protilátky. Syntéza je vykonávaná pomocou súpravy AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Corporation) alebo pomocou inej. cDNA môže byť tiež syntetizovaná a amplifikovaná pomocou metódy 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavski, A. a kol., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) pomocou súpravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONETECH) v kombinácii s metódou PCR, alebo podobnej.

Fragment DNA, o ktorý sa jedná, je izolovaný a purifikovaný z výsledného PCR produktu a potom je ligovaný do DNA vektora, čím je získaný rekombinantný vektor. Rekombinantný vektor je vnesený do hostiteľa ako je *E. coli* a je vybraná kolónia obsahujúca požadovaný rekombinantný vektor. Nukleotidová sekvencia DNA,

o ktorú sa v rekombinantnom vektore jedná, je potvrdená pomocou napríklad metódy ukončenia reťazca pomocou dideoxynukleotidov.

Keď je raz DNA kódujúca V oblasť protilátky proti PTHrP získané, DNA je zabudovaná do expresného vektoru, ktorý obsahuje DNA kódujúce konštantnú (C) oblasť požadovanej protilátky.

Pre produkovanie protilátky proti PTHrP, používanej v predloženom vynáleze, je protilátkový gén zabudovaný do expresného vektoru tak, že protilátkový gén môže byť exprimovaný pod kontrolou oblasťou kontrolujúcich expresiu (napríklad zosilňovač transkripcia, promotor). Hostiteľská bunka je expresným vektorom transformovaná, aby exprimovala protilátky.

Pri exprimovaní protilátkového génu môžu byť DNA kódujúca ťažký (H) reťazec a DNA kódujúca ľahký (L) reťazec protilátky zabudované do oddelených expresných vektorov, a potom je hostiteľská bunka transformovaná súčasne výslednými rekombinantnými expresnými vektormi. Inou možnosťou je, že obe DNA, DNA kódujúca H-reťazec a DNA kódujúca L-reťazec protilátky, môžu byť zjednotené spoločne do jedného expresného vektoru, a potom môže byť hostiteľská bunka transformovaná výsledným rekombinantným expresným vektorom (WO 94/11 523).

Pre produkciu rekombinantnej protilátky môže byť vedľa vyššie spomínaných hostiteľských buniek použité ako hostiteľ transgénne zviera. Napríklad protilátkový gén je vložený do predom určeného miesta v géne, ktorý kóduje proteín prirodzene produkovaný v mlieku zvierat'a (napr. kozí (3-kazeín), a je získaný fúzny gén. Fragment DNA obsahujúci fúzny gén s protilátkovým génom je injekčne podávaný koziemu embryu a toto je vnesené do kože samice. Tieto kozie samice potom nosia transgénnu kozu. Protilátka o ktorú sa jedná, je potom vylučovaná v mlieku transgénnej kozy alebo jej potomkov. Za účelom zvýšenia produkcie mlieka u transgénnej kozy, ktoré obsahuje protilátku, môže byť tejto transgénnej koze podaný vhodný hormón (Ebert, K. M. a kol., Bio/Technology (1994) 12,699-702).

4. Modifikovaná protilátka

Za účelom zníženia reaktivity proti zložkám ľudského tela, môže byť v predloženom vynáleze použitia umelo modifikovaná rekombinantná protilátka, ako je chimérna protilátka alebo zušľachtená protilátka. Modifikované protilátky môžu byť pripravené pomocou nasledujúcich známych postupov.

Chimérna protilátka, ktorá je použiteľná v predloženom vynáleze, môže byť pripravená ligáciou DNA kódujúca V oblasť protilátky, pripravenou ako bolo popísané vyššie, s DNA kódujúcej C oblasť ľudskej protilátky, zabudovaním produktu ligácie do expresného vektoru a vnesením výsledného rekombinantného expresného vektoru do hostiteľa, aby produkoval chimérnu protilátku.

Zušľachtená protilátka je tiež označovaná ako „pretvorená ľudská protilátka“, v ktorej sú oblasti protilátky určujúce komplementaritu (CDR) z protilátky cicavca iného ako človek (napríklad myš) prenesené na miesto CDR ľudskej protilátky. Sú tiež známe všeobecné genetické rekombinantné postupy pre prípravu takých zušľachtených protilátok (EP 125 023; WO 96/02 576).

Presnejšie povedané, DNA sekvencie do ktorej sú CDR z myšej protilátky ligované prostredníctvom podporných oblastí (FR) ľudskej protilátky, je amplifikovaná PCR metódou za pomoci niekoľkých oligonukleotidov ako primerov, ktoré boli navrhnuté tak, aby mali oblasti prekrývajúce sa s koncovými oblasťami CDR a FR. Získaná DNA je ligovaná do DNA kódujúcej C oblasť ľudskej protilátky a výsledný produkt ligácie je zabudovaný do expresného vektoru. Získaný rekombinantný expresný vektor je vnesený do hostiteľa, ktorý potom produkuje zušľachtenú protilátku (EP 239 044, WO 96/02 576).

Oblasti FR ľudskej protilátky, ligovanej prostredníctvom CDR, sú vybrané tak, že CDR môžu vytvoriť väzobné miesto pre vhodný antigén. Pokiaľ je to nevyhnutné, aminokyselina (aminokyseliny) vo FR oblastiach V oblasti protilátky môžu byť zamenené tak, že CDR pretvorené ľudské protilátky môžu vytvoriť väzobné miesto pre vhodný antigén (Sato, K. a kol., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

C oblasť chimérnej alebo zušľachtenej protilátky môže byť akákoľvek ľudská C oblasť, ako sú C λ 1, C λ 2, C λ 3, alebo C λ 4, pre H reťazec a C κ alebo C λ pre L reťazec.

C oblasť ľudskej protilátky môže byť modifikovaná za účelom zabezpečenia stabilnej produkcie protilátky.

Chimérna protilátka je zložená z V oblastí odvodených z protilátky cicavca, iného ako je človek, a z C oblastí odvodených z ľudskej protilátky. Zušľachtená protilátka je vhodná ako aktívna zložka terapeutického činidla, ktoré je predmetom tohto vynálezu, pretože antigenicita protilátky proti ľudskému telu je znížená.

Špecifickým príkladom zušľachtenej protilátky, vhodnej pre predložený vynález, je zušľachtená protilátka #23-57-137-1; v ktorej sú CDR odvodené z myšej protilátky #23-57-137-1; L reťazec je zložený z CDR ligovaných prostredníctvom troch FR (FR1, FR2 a FR3), odvodených z ľudskej protilátky HSU 03 368 (GEN-BANK, Deftos, M. a kol., Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) a FR (FR4), odvodené z ľudskej protilátky S 25 755 (NBRF-PDB); a H reťazec je zložený z CDR ligovaných prostredníctvom FR, odvodených z ľudskej protilátky S 31 679 (NBRF-PDB, Cuisinier, A. a kol., Eur. J. Immunol. 23, 119-118, 1993), v ktorých je časť aminokyselinových zbytkov v FR vymenená tak, že pretvorená zušľachtená protilátka môže vykazovať väzobnú aktivitu pre antigén.

Kmeň *E. coli* obsahujúci plazmidy, ktoré majú DNA kódujúcu H reťazec poprípadne L reťazec zušľachtenej protilátky #23-57-137-1, sú označené *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) (pre H reťazec), poprípadne *Escherichia coli* JM109 (hMBC1LqA/pUC19) (pre L reťazec). Tieto kmene boli uložené za podmienok budapeštianskej zmluvy 15. augusta 1996 v Národnom ústave biologických vied a ľudskej technológie, Agentúra priemyselnej vedy a technológie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod prístupovým číslom FERM BP-5629 pre *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) a pod prístupovým číslom FERM BP-5630 pre *Escherichia coli* JM109 (hMBC1LqA/pUC19). 5. Varianty protilátok.

Protilátka použitá v predloženom vynáleze môže byť fragment protilátky alebo modifikovaná forma fragmentu, pokiaľ je schopný sa viazať k PTHrP a inhibovať aktivitu PTHrP. Napríklad fragment protilátky zahŕňa Fab, F(ab')₂, Fv alebo jednoreťazcový Fv (scFv), skladajúci sa z Fv fragmentu H reťazca a Fv fragmentu L

reťazca, spojených dohromady vhodným spojovníkom. Presnejšie povedané, také fragmenty protilátok môžu byť vytvorené štepením protilátky pomocou enzýmu (napríklad papaín, pepsín) na protilátkové fragmenty, alebo skonštruovaním génu kódujúceho fragment protilátky, vložení génu do expresného vektoru a vnesením výsledného expresného vektoru do vhodného hostiteľa, ktorý potom fragment protilátky exprimuje (viď. napríklad Čo, M. S. a kol., J. Immunol. (1994), 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989), 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology (1989), 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989), 121, 652-663; Rousseaux, J. a kol., Methods in Enzymology (1989), 121, 663-669; a Bird, R. E. a kol., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

scFv môže byť vytvorený spojením V oblasti H reťazca s V oblasťou L reťazca prostredníctvom spojovníka, s výhodou pomocou peptidového spojovníka (Huston, J. S. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). V oblasť H reťazca a V oblasť L reťazca v scFv môže byť odvodená z akejkoľvek tu popísanej protilátky. Peptidový spojovník, ktorý viaže V oblasti, môže byť akýkoľvek jednoreťazcový peptid, dlhý napríklad 12 až 19 aminokyselinových zvyškov.

DNA kódujúca scFv môže byť pripravená najskôr amplifikáciou DNA kódujúcej V oblasť H reťazca a DNA kódujúcej V oblasť L reťazca protilátky tak, že sú ako matrice oddelene použité DNA fragment kódujúci celú oblasť alebo časť H reťazca, ktorý obsahuje V oblasť a DNA fragment kódujúci celú oblasť alebo časť L reťazca, ktorý obsahuje V oblasť, a páry primerov, ktoré definujú konce DNA fragmentov; a potom amplifikáciu DNA kódujúcej peptidový spojovník, pomocou DNA fragmentu kódujúceho peptidový spojovník ako matrice a páru primerov, ktoré definujú konce DNA fragmentu tak, že každý koniec peptidového spojovníku je pripojený k V oblasti H reťazca, poprípade k V oblasti L reťazca.

Keď je raz DNA kódujúca scFv pripravená, môže byť pomocou bežných postupov pripravený expresný vektor nesúci túto DNA a hostiteľ transformovaný týmto expresným vektorom. scFv môže byť produkován transformovaným hostiteľom pomocou bežných postupov.

Fragmenty protilátky môžu byť vytvorené tak, že sú pripravené gény pre tieto fragmenty a gény sú exprimované vo vhodných hostiteľoch, ako bolo popísané vyššie. Fragmenty protilátky sú tiež zahrnuté medzi „protilátky“ predloženého vynálezu.

Ako modifikované formy vyššie uvedených protilátok môžu byť tiež použité napríklad protilátky proti PTHrP, konjugované k nejakej molekule (napríklad polyetylén glykol). Také modifikované protilátky sú tiež zahrnuté medzi „protilátky“ predloženého vynálezu. Modifikované protilátky môžu byť pripravené pomocou chemických modifikácií protilátok. Postupy chemickej modifikácie, vhodné pre tento účel, boli už v odbore zavedené.

6. Expresia a produkcia rekombinantnej protilátky alebo modifikovanej protilátky

Gén pre protilátku, skonštruovaný ako bolo popísané vyššie, môže byť vytvorený a exprimovaný pomocou známych postupov. Pre exprimovanie v savčej bunke sú operatívne spojené bežný vhodný promotor, gén protilátky, ktorý má byť exprimovaný a signál pre poly(A) (umiestený v smere za 3' koncom génu pre protilátku). Napríklad ako vhodný systém promotor/zosilňovač transkripcie môže byť použitý systém z ľudského cytomegalovírusu bezprostredne skorý promótor/zosilňovač transkripcie.

Iné systémy promótor/zosilňovač transkripcie, vhodné pre expresiu protilátky a použité v predložennom vynáleze, obsahujú tie systémy, ktoré sú odvodené z vírusov (napríklad retrovírusu, polyomavírusu, adenovírusu a opičieho vírusu 40 (SV40)) a tie systémy, ktoré sú odvodené z cicavčích buniek (napríklad ľudský elongačný fragment 1a (HEF1a)).

Keď je použitý systém SV40 promotor/zosilovač transkripcie, expresia génu môže byť vykonaná jednoducho pomocou postupu od Mulligan a kol., (Nature (1979) 277, 108). Keď je použitý systém HEF1q promótor/zosilňovač transkripcie, expresia génu môže byť vykonaná jednoducho pomocou postupu od Mizushima a kol., (Nucleic Acids Res. (1990) 18,5322).

Pre expresiu v *E. coli* môžu byť operatívne spojené bežný vhodný promótor, signálna sekvencia pre vylučovanie protilátky o ktorú sa jedná, a gén protilátky. Ako promotor môže byť použitý promótor lacZ alebo araB. Keď je použitý promótor lacZ, expresia génu môže byť vykonaná pomocou postupu od Ward a kol., (*Nature* (1998) 341; 544-546; *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427). Keď je použitý promótor araB, expresia génu môže byť vykonaná pomocou postupu od Better a kol., *Science* (1988) 240; 1041-1043).

Pokiaľ sa týka signálnej sekvencie pre vylučovanie protilátky, keď má byť protilátka o ktorú sa jedná, vylučovaná do periplazmatického priestoru *E. coli*, môže byť použitá signálna sekvencia pe1B (Lei, S. P. a kol., *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379). Protilátka vylučovaná do periplazmatického priestoru je izolovaná a potom znovu priestorovo usporiadaná tak, že protilátka získa konfiguráciu vhodnú pre použitie.

Pokiaľ sa týka počiatku replikácie, môžu byť použité počiatky replikácie odvodené z vírusov (napríklad SV40, polyomavírusu, adenovírusu, hovädzieho papilomavírusu (BPV)) alebo podobné. Aby sa zvýšil počet kópií génu v hostiteľskom bunkovom systéme, môže ďalej expresný vektor obsahovať selektovateľný značiaci gén, ako je napríklad gén pre aminoglykosidfosforibozyltransferázu (APH), gén pre tymidinkinázu (TK), gén pre xantinguanidínfosforibozyltransferázu *E. coli* (Ecogpt) a gén pre dihydrofolátreduktázu (dhfr).

Pre produkciu protilátky použitej v predloženom vynáleze, môže byť použitý akýkoľvek expresný systém, ako sú eukaryotické a prokaryotické expresné systémy. Eukaryotické bunky obsahujú zavedené živočíšne bunkové línie (napríklad z cicavcov, hmyzu, plesní a húb, kvasníc). Prokaryotické bunky obsahujú bakteriálne bunky, ako sú bunky *E. coli*.

Je výhodné, keď je protilátka používaná v predloženom vynáleze exprimovaná v cicavčej bunke, ako je bunka CHO, COS, myeloma, BHK, Vero alebo HeLa.

Ďalej je transformovaná hostiteľská bunka kultivovaná *in vitro* alebo *in vivo*,

aby produkovala protilátky, o ktoré sa jedná. Kultivácia hostiteľských buniek môže byť vykonaná pomocou akéhokoľvek známeho postupu: Môže tu byť použiteľné kultivačné médium DMEM, MEM, RPMI 1640 alebo IMDM. Kultivačné médium môže obsahovať doplnok séra, ako je fetálne tel'acie sérum (FCS).

7. Izolácia a purifikácia protilátky

Protilátka exprimovaná a produkovaná tak, ako bolo popísané vyššie, môže byť izolovaná z buniek alebo z tela hostiteľského živočícha a vyčistená do homogenity. Izolácia a purifikácia protilátky, používanej v predloženom vynáleze, môže byť vykonaná na afinitnom stĺpci. Príklady stĺpcov s proteínom A obsahujú stĺpce Hyper D, POROS a Sepharose F.F. (Pharmacia). Postup nie je žiadnym zvláštnym spôsobom obmedzený a môžu byť použité aj iné postupy, ktoré sú bežne používané pre izoláciu a purifikáciu protilátky. Napríklad môžu byť použité rozmanité chromatografické postupy, ktoré používajú iné stĺpce ako sú vyššie spomenuté afinitné stĺpce, používajúce filtráciu, ultrafiltráciu, vysol'ovanie a dialýzu, buď samotné alebo v kombinácii, pre izoláciu a vyčistenie protilátky, o ktorú sa jedná (Protilátky: Laboratórna príručka, vyd. Harlow, David Lané, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

8. Určovanie aktivít protilátky

Určovanie väzobnej aktivity k antigénu (Protilátky: Laboratórna príručka, vyd. Harlow, David Lané, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) alebo inhibičné aktivity proti ligandu receptora (Harada, A. a kol., International Immunology (1993) 5, 681-690) u protilátky používanej v predloženom vynáleze, môže byť vykonané pomocou akýchkoľvek známych postupov. Postupy pre určenie väzobnej aktivity k antigénu protilátky proti PTHrP, používané v predloženom vynáleze, môžu byť test ELISA (imunoabsorbčný test zviazaným enzýmom), EIA (enzýmový imunologický test), RIA (rádioimunotest) alebo fluorescenčná protilátka. Napríklad keď je vykonávaný enzýmový imunologický test, roztok vzorky, obsahujúce protilátku proti PTHrP (napríklad supernatant z kultúry buniek produkujúcich protilátku proti PTHrP alebo protilátku proti PTHrP v čistenej forme), je pridaný na doštičku, ktorá bola najskôr potiahnutá PTHrP (1-34). Ďalej je na doštičku pridaná sekundárna protilátka,

označený enzýmom (napríklad alkalickou fosfatázou). Doštička je inkubovaná a premytá. K doštičke je pridaný substrát pre enzým (napríklad kyselina p-nitrofenylfosforečná) a je meraná absorbanca roztoku, aby bola zhodnotená väzobná aktivita protilátky k antigénu.

Pre potvrdenie aktivity protilátky použitej v predložennom vynáleze, môže byť stanovená neutralizačná aktivita protilátky (napríklad u protilátky proti PTHrP).

9. Spôsoby podávania a farmaceutické prípravky

Terapeutické činidlo predloženého vynálezu môže byť použité na liečenie alebo zlepšenie hyperkalcinémie, ktorá je odolná k liekom. Hyperkalcinémia, ktorá je odolná k liekom, môže byť typ indukovaný rakovinou alebo typ iný. Príkladom hyperkalcinémie indukovanej rakovinou je hyperkalcinémia indukovaná zhubným bujnením.

Príklady hyperkalcinémie, ktoré nie sú indukované rakovinou, obsahujú perinatálnu hyperkalcinémiu u gravidných a kojacich žien a novorodeneckú hyperkalcinémiu.

Terapeutické činidlo, obsahujúce ako svoju aktívnu zložku protilátku proti PTHrP, ktorá je predmetom predloženého vynálezu, môže byť podávaná orálne alebo parenterálne, s výhodou parenterálne. Terapeutické činidlo môže byť v akejkoľvek dávkovej forme, ako je činidlo podávané pľúcami (napríklad činidlo podávané s pomocou takého zariadenia ako je rozprašovač), nazogastrické činidlo, kožné činidlo (masť, krém) alebo injekcia. Príklady injekcií obsahujú vnútrožilovú injekciu (napríklad kvapky), vnútro svalovú injekciu, intraperitoneálnu injekciu a podkožnú injekciu pre systémové alebo miestne podávaní. Spôsob podávania môže byť vhodne vybraný v závislosti od veku pacienta a stavu choroby. Účinná jednotlivá dávka môže byť vybraná v rozsahu od 0,001 do 1 000 mg na kg telesnej hmotnosti, s výhodou 0,1 až 50 mg na kg telesnej hmotnosti, ešte výhodnejšie 0,5 až 10 mg na kg telesnej hmotnosti. Iná možnosť je, že dávka pre pacienta môže byť vybraná v rozsahu od 0,01 do 100 000 mg/osobu, s výhodou 1 až 5000 mg/osobu, ešte výhodnejšie 10 až 500 mg/osobu. Avšak dávka terapeutického činidla, obsahujúca

protilátku proti PTHrP, ktorá je predmetom tohto vynálezu, nie je príliš na tieto rozsahy obmedzená.

Terapeutické činidlo môže byť podávané pacientovi v akomkoľvek stave, vrátane pred alebo po vývoji hyperkalcinémie, odolnej proti liekom. Terapeutické činidlo môže byť tiež podané v stave, keď je u pacienta predpovedaná strata telesnej hmotnosti.

Terapeutické činidlo obsahujúce ako svoju aktívnu zložku protilátku proti PTHrP môže byť zostavené akýmkoľvek bežným postupom (Remington's Pharmaceutical Science, posledné vydanie, Mark Publishing Company, Easton, USA). Prípravok môže ďalej obsahovať farmaceuticky prijateľné nosiče a prísady.

Príklady takých nosičov a prísad obsahujú vodu, farmaceuticky prijateľné organické rozpúšťadlá, kolagén, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidon, karboxyvinylový polymér, sodnú soľ karboxymetylcelulózy, polymér akrylátu sodného, sodnú soľ kyseliny arginovej, vo vode rozpustný dextran, sodnú soľ karboxymetylového derivátu škrobu, pektín, metylcelulózu, etylcelulózu, xantanovú gumu, arabskú gumu, kazeín, agar, polyetylénglykol, diglycerín, glycerín, propylénglykol, vazelínu, parafín, stearylalkohol, kyselinu stearovú, ľudský sérumalbumín (HSA), manit, sorbit, laktózu a povrchové aktívne činidlá, prijateľné ako farmaceutické prísady.

Pri praktickom použití je prísada vhodne vybraná z vyššie uvedených členov buď samostatne alebo v kombinácii, ktorá závisí na (bez obmedzenia) použitej dávkovej forme. Napríklad pre použitia v forme podávanej pomocou injekcie, je protilátka proti PTHrP v čistej forme rozpustená v rozpúšťadle (napríklad fyziologický roztok, pufor, roztok hroznového cukru) a potom je k tomu pridané činidlo zabraňujúce adsorpcii a príklad Tween 80, Tween 20, želatína, ľudský sérumalbumín). Terapeutické činidlo, ktoré je predmetom tohto vynálezu, môže tiež byť v lyofilizovanej forme, ktorá sa pred použitím rozpustí. Pre prípravu lyofilizovanej dávkovej formy môžu byť použité excipienty, ako je cukrový alkohol (napríklad manit, hroznový cukor).

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 je graf znázorňujúci výsledky farmakologickej štúdie na zvieracom modeli hyperkalcinémie, ktorá je odolná na bifosfonát.

Obrázok 2 je graf znázorňujúci výsledky farmakologickej štúdie na zvieracom modeli hyperkalcinémie, ktorá je odolná na bifosfonát.

Obrázok 3 je graf znázorňujúci výsledky farmakologickej štúdie na zvieracom modeli hyperkalcinémie, ktorá je odolná na kalcitonín.

Obrázok 4 je graf znázorňujúci výsledky farmakologickej štúdie na zvieracom modeli hyperkalcinémie, ktorá je odolná na kalcitonín.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Ďalej tu bude predložený vynález popísaný do väčších detailov s odkazom na nasledujúce referenčné príklady a príklady, ktoré by nemali byť chápané ako obmedzujúce pre technický rozsah vynálezu.

Príklad 1: Farmakologická štúdia na zvieracom modeli hyperkalcinémie odolnej k bifosfonátu

(1) Cieľ štúdie

Vytvoriť zvierací model hyperkalcinémie odolnej k bifosfonátu pomocou zvieracieho modelu hyperkalcinémie (nahá krysa s implantovaným ľudským nádorom) a vyskúšať terapeutický účinok zušľachtenej monoklonálnej protilátky proti PTHrP na úroveň vápnika v krvi u modelového zvieraťa.

(2) Metódy

Ako zvierací model bola použitá nahá krysa s implantovaným ľudským pľúcnym karcinómom veľkých buniek LC-6 [zakúpená v Centrálnom ústave pre pokusné zvieratá]. Je známo, že nahá krysa s implantovaným ľudským pľúcnym

karcinómom veľkých buniek LC-6 vykazuje súčasne so zväčšujúcim sa objemom nádoru zvýšenú hladinu vápnika v krvi a nastáva u nej strata telesnej hmotnosti atd. Potom, čo bola hyperkalcinémia potvrdená, bol zvieraciemu modelu opakovane podávaný alendronát, čo je druh bifosfonátu, kým nedošlo k tomu, že v krvi nebolo pozorované žiadne vylepšenie hladiny vápnika v krvi, inými slovami, kým zvierací model nezískal rezistenciu k bifosfonátu. Týmto spôsobom bol vytvorený zvierací model hyperkalcinémie odolnej k bifosfonátu. Ľudský pľúcny karcinóm veľkých buniek LC-6 bol kultivovaný *in vivo* na nahých myšiach BALB/c-nu/nu (CLEA Japonsko, Inc.).

Priaznivý účinok zušľachtenej monoklonálnej protilátky u krysieho modelu hyperkalcinémie, ktorá je odolná k bifosfonátu bol hodnotený s ohľadom na telesnú hmotnosť a úroveň krvného vápnika v krvi myší.

Pre zhodnotenie farmakologických účinkov zušľachtenej monoklonálnej protilátky boli zakúpené 5 týždňov staré samce nahých myší F344/N Jcl-rnu (CLEA Japan, Inc.) a aklimatizované jeden týždeň. Potom bol týmto 6 týždňov starým krýsám implantovaný nádor, a krysy so zvýšenou hladinou vápnika v krvi a so zníženou telesnou hmotnosťou boli použité ako zvierací model hyperkalcinémie. Boli pripravené zvieracie modely hyperkalcinémie odolné na bifosfonát a nasledujúcim spôsobom boli rozdelené do skupín. Kultivovaný ľudský pľúcny karcinóm veľkých buniek LC-6 bol odobraný z nahej myši a potom jemne narezaný na kocky s hranou 3 mm. Získané nádorové bločky boli implantované každej krýse pod kožu na bokoch v pomere 1 blok na myš. Asi jeden a pol mesiaca po implantácii boli krysy so zvýšenými hladinami vápnika v krvi a so zníženou telesnou hmotnosťou (teda zvierací model hyperkalcinémie) rozdelené do skupín tak, že hladiny vápnika v krvi a telesné hmotnosti krýs v jednotlivých skupinách boli spriemerované.

Alendronát vo forme známeho farmaceutického preparátu pre hyperkalcinémiu (injekcie sodnej soli hydrátu alendronátu, „Teiroc Injection“ od Teijin Limited) bol podávaný každej skupine zvieracích modelov hyperkalcinémie chvostovou žilou dvakrát týždeň v dávkach 2,5 mg/kg. Ako kontrola bol podávaný fosfátom pufrovaný fyziologický roztok (PBS) každému zvieraťu v inej skupine zvieracích modelov hyperkalcinémie chvostovou žilou dvakrát týždeň. V skupine zvieracích modelov,

ktorým bol podávaný alendronát, boli tie zvieratá, u ktorých sa neprejavilo žiadne zlepšenie krvnej hladiny vápnika po piatich podaniach alendronátu (teda podaný v dňoch 0, 3, 7, 10 a 14), rozpoznané ako zvieracie modely hyperkalcinémie, odolnej k bifosfonát. Na 17. deň boli takto rozpoznané modelové zvieratá rozdelené do skupín tak, že hladiny vápnika v krvi a telesnej hmotnosti krýs v jednotlivých skupinách boli spriemerované.

Skúšanie terapeutického účinku na hyperkalcinémiu, odolnú na bifosfonát, bolo vykonaná nasledujúcim spôsobom. V testovanej skupine zvieracích modelov hyperkalcinémie, odolnej k bifosfonátu (ktoré boli vytvorené a rozdelené do skupín ako bolo uvedené vyššie), boli podávané každému zvieraciemu modelu do chvostovej žily buď 3 mg/kg zušľachtenej monoklonálnej protilátky proti PTHrP alebo 2,5 mg/kg alendronátu. V kontrolnej skupine bol každému zvieraciemu modelu podávaný do chvostovej žily PBS.

Určovanie hladín vápnika v krvi a telesnej hmotnosti bolo vykonávané 3., 7., 10., 14. a 17. deň po podaní buď alendronátu alebo PBS. Modelové zvieratá zo skupiny, ktorej bol podávaný alendronát, boli na 17. deň rozdelené do skupín tak, že hladiny vápnika v krvi a telesné hmotnosti krýs v jednotlivých skupinách boli spriemerované. V každej z testovaných skupín bola podávaná alebo zušľachtená monoklonálna protilátka alebo alendronát. V kontrolnej skupine bol podávaný PBS. Štvrtý a siedmy deň po podaní zušľachtenej monoklonálnej protilátky alebo alendronátu, bola u každého zvieratá meraná hladina vápnika v krvi a telesná hmotnosť, aby bola určená farmakologická účinnosť.

Hladina vápnika v krvi bola určovaná ako celkové množstvo ionizovaného vápnika v krvi tak, že každému zvieratú bola z chvostovej žily odobraná krv pomocou hematokritovej skúmavky a na meranie bol použitý automatický analyzátor Ca/pH, model 643 (CIBA-CORNING).

(3) Výsledky

Zvieracie modely hyperkalcinémie odolné na bifosfonát boli úspešne vytvorené tak, že bol bifosfonát podávaný opakované celkom päťkrát, pričom

intervalu boli dvakrát v týždni. Zušľachtená monoklonálna protilátka, ktorá je predmetom tohto vynálezu, môže zlepšiť hladinu vápnika v krvi u zvieracieho modelu hyperkalcinémie odolnej k bifosfonátu (Obr. 1). V skupine zvierat, ktorým bola podávaná protilátka bolo tiež pozorované obnovenie telesnej hmotnosti (Obr. 2). Z týchto výsledkov bolo uzavreté, že zušľachtená monoklonálna protilátka proti PTHrP je užitočná ako terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu spôsobenú zhubným bujnením, ktorá získala odolnosť na bifosfonát.

Príklad 2: Farmakologický test na zvieracom modeli hyperkalcinémie odolnej na kalcitonín.

(1) Cieľ štúdie

Vytvoriť zvierací model hyperkalcinémie odolnej na kalcitonín pomocou zvieracieho modelu hyperkalcinémie (nahá krysa s implantovaným ľudským nádorom) a vyskúšať terapeutický účinok zušľachtenej monoklonálnej protilátky proti PTHrP na úroveň vápnika v krvi u modelového zvierat'a.

(2) Metódy

Ako zvierací model bola použitá nahá krysa s implantovaným ľudským pľúcnym karcinómom veľkých buniek LC-6 [kúpená v Centrálnom ústave pre pokusné zvieratá]. Je známe, že nahá krysa s implantovaným ľudským pľúcnym karcinómom veľkých buniek LC-6 vykazuje súčasne so zväčšujúcim sa objemom nádoru zvýšenú hladinu vápnika v krvi a nastáva u nej strata telesnej hmotnosti atď. Potom, čo bola hyperkalcinémia potvrdená, bol zvieraciemu modelu opakovane podávaný elcatonin, čo je druh kalcitonínu, kým nedošlo k tomu, že v krvi nebolo pozorované žiadne vylepšenie hladiny vápnika v krvi, inými slovami, kým zvierací model nezískal rezistenciu na kalcitonín. Týmto spôsobom bol vytvorený zvierací model hyperkalcinémie odolnej k kalcitonínu. Ľudský pľúcny karcinóm veľkých buniek LC-6 bol kultivovaný *in vivo* na nahých myšiach BALB/c-nu/nu (CLEA Japonsko, Inc.).

Priaznivý účinok zušľachtenej monoklonálnej protilátky v krysom modeli

hyperkalcinémie, ktorá je odolná na kalcitonín, bol hodnotený s ohľadom na telesnú hmotnosť a úroveň krvného vápnika v krvi krýs.

Pre zhodnotenie farmakologických účinkov zušľachtenej monoklonálnej protilátky boli zakúpené 5 týždňov staré samce nahých myší F344/N Jcl-rnu (CLEA Japan, Inc.) a aklimatizované jeden týždeň. Potom bol týmto 6 týždňov starým krysám implantovaný nádor, a krysy so zvýšenou hladinou vápnika v krvi a so zníženou telesnou hmotnosťou boli použité ako zvierací model hyperkalcinémie. Boli pripravené zvieracie modeli hyperkalcinémie odolnej k bifosfonátu a nasledujúcim spôsobom boli rozdelené do skupín. Kultivovaný ľudský pľúcny karcinóm veľkých buniek LC-6 bol odobraný z nahej myši a potom jemne narezaný na kocky s hranou 3 mm. Získané nádorové bločky boli implantované každej krýse pod kožu na bokoch v pomere 1 blok na myš. Asi jeden a pol mesiaca po implantácii boli krýsy so zvýšenými hladinami vápnika v krvi a so zníženou telesnou hmotnosťou (teda zvierací model hyperkalcinémie) rozdelené do skupín tak, že hladiny vápnika v krvi a telesné hmotnosti krýs v jednotlivých skupinách boli spriemerované.

Elcatonín („Elcitonin Injection“ od Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) bol podávaný každej skupine zvieracích modelov hyperkalcinémie chvostovou žilou dvakrát denne v dávke 10 j/kg (v intervaloch 12 hodín). Ako kontrola bol podávaný PBS každému zvieraťu v inej skupine zvieracích modelov hyperkalcinémie chvostovou žilou dvakrát do týždňa. V skupine zvieracích modelov, ktorým bol podávaný elcatonín, boli tie zvieratá, u ktorých sa neprejavilo žiadne zlepšenie krvnej hladiny vápnika po dvanástich podaniach elcatonínu (teda podaní v dňoch 0, 1, 2, 3, 4 a 5 dvakrát denne), rozpoznaná ako zvieracie modeli hyperkalcinémie, odolnej k elcatonínu. Tieto rozpoznané modelové zvieratá boli rozdelené do skupín tak, že hladiny vápnika v krvi a telesné hmotnosti krýs v jednotlivých skupinách boli spriemerované.

Skúšanie terapeutického účinku na hyperkalcinémiu, odolnú na elcatonín, bolo vykonané nasledujúcim spôsobom. V testovanej skupine zvieracích modelov hyperkalcinémie, odolnej k elcatonínu (ktoré boli vytvorené a rozdelené do skupín ako bolo uvedené vyššie), bola podávaná každému zvieraciemu modelu do

chvostovej žily buď zušľachtená monoklonálna protilátka proti PTHrP (3 mg/kg) alebo PBS. V kontrolnej skupine bol každému zvieraciemu modelu podávaný do chvostovej žily PBS.

Určovanie hladín vápnika v krvi bolo vykonávané v dňoch 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 a 6 po podaní buď elcatonínu alebo PBS. Zisťovanie telesnej hmotnosti bolo vykonávané v dňoch 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 a 6 po podaní buď elcatonínu alebo PBS. Modelové zvieratá zo skupiny, ktorej bol podávaný elcatonín, boli 6. deň rozdelené do skupín tak, že hladiny vápnika v krvi a telesná hmotnosť krýs v jednotlivých skupinách bola spriemerovaná. V každej z testovaných skupín bola podávaná alebo zušľachtená monoklonálna protilátka alebo PBS. V kontrolnej skupine bol podávaný PBS. Prvý a tretí deň po podaní zušľachtenej monoklonálnej protilátky alebo PBS, bola u každého zvieraťa meraná hladina vápnika v krvi a telesná hmotnosť, aby bola určená farmakologická účinnosť.

Hladina vápnika v krvi bola určovaná ako celkové množstvo ionizovaného vápnika v krvi tak, že každému zvieraťu bola z chvostovej žily odobraná krv pomocou hematokritovej skúmavky a na meranie bol použitý automatický analyzátor Ca/pH, model 643 (CIBA-CORNING).

(3) Výsledky

Zvieracie modeli hyperkalcinémie odolnej na kalcitonín boli úspešne vytvorené tak, že bol kalcitonín podávaný opakovane celkom dvanásťkrát v intervaloch dvakrát za deň. Zušľachtená monoklonálna protilátka úspešne zlepšila hladinu vápnika v krvi vo zvieracom modeli hyperkalcinémie odolnej na kalcitonín (Obr. 3). U skupiny zvierať, ktorým bola podávaná protilátka bolo tiež pozorované obnovenie telesnej hmotnosti (Obr. 4). Z týchto výsledkov bolo vyvodené, že zušľachtená monoklonálna protilátka proti PTHrP je užitočná ako terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu spôsobenú zhubným bujnením, ktorá získala odolnosť na kalcitonín.

Referenčný príklad 1: Príprava hybridomov produkujúcich krysiu monoklonálna protilátku (1-34) proti PTHrP.

Hybridomy schopné produkovať monoklonálnu protilátku proti ľudskému PTHrP (1-34) (SEQ ID NO: 75), #23-57-154 a #23-57-137-1 boli pripravené nasledujúcim spôsobom (viď. SATO, K. a kol., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993). Aminokyselinová sekvencia ľudského PTHrP (1-34) je uvedená v SEQ ID NO: 75.

Na použitie ako imunogén bol PTHrP (1-34) (Peninsula) pomocou karbodiimidu (Dojinn) konjugovaný s proteínom tyroglobulínom ako nosičom. PTHrP (1-34) konjugovaný s tyroglobulínom bol dialyzovaný, aby bol získaný roztok s koncentráciou proteínu 2 µg/ml. Výsledný roztok bol miešaný s Freudovým adjuvans (Difco) v pomere 1:1 aby bola získaná emulzia. Táto emulzia bola injekčne jedenásťkrát podaná podkožne 16 samiciam myšieho kmeňa BALB/C, na chrbtoch alebo intraperitoneálne, v dávke 100 µg/myš v každej injekcii, čím boli myši imunizované. Pre začiatok imunizácie bolo použité kompletne Freudovo adjuvans; zatiaľ, čo pre posilovaciu imunizáciu bolo použité nekompletné Freudovo adjuvans.

V každej imunizovanej myši bol zisťovaný jej titer protilátok v sére nasledujúcim spôsobom. Každéj myši bola odobratá krv z chvostovej žily a od krvi bolo oddelené antisérum. Antisérum bolo zriedené RIA pufrom a na určenie väzobnej aktivity bolo miešané s PTHrP (1-34) označeným ^{125}I . Myšiam, u ktorých bolo potvrdené, že majú dostatočne zvýšený titer, bol pre záverečnú imunizáciu podaný injekčne intraperitoneálne PTHrP (1-34) bez proteínového nosiča, v dávke 50 µg/myš.

Tri dni po záverečnej imunizácii boli myši usmrtené a bola z nich odobratá slezina. So slezinými bunkami bola vykonaná bunková fúzia s myšacou myelomovou bunkovou líniou P3x63Ag8U.1 podľa obecného známeho postupu za použitia 50% polyetylén glykolu 4000. Takto pripravené fúzované bunky boli vysiate do doštičiek s 96 jamkami v hustote 2×10^4 /jamku. Hybridomy boli triedené v médiu HAT nasledujúcim spôsobom.

Triedenie hybridomov bolo vykonané pomocou testu RIA na pevnej fáze, zisťovaním prítomnosti protilátok rozpoznávajúcich PTHrP v supernatante bunkových kultúr v jamkách, v ktorých bol pozorovaný rast buniek v médiu HAT. Hybridomy boli

zbierané z jamiek, v ktorých bola potvrdená väzobná schopnosť protilátok rozpoznávajúcich PTHrP. Takto získané hybridomy boli suspendované v médiu RPMI-1640 obsahujúcom 15 % FCS doplnené doplnkom OPI (Sigma), a nasledovala unifikácia hybridomov pomocou metódy koncového riedenia. Tak boli získané dva typy hybridomových klonov, #23-57-154 a #23-57-137-1, kde oba vykazujú vysokú schopnosť väzby k PTHrP (1-34).

Hybridomový klon #23-57-137-1 bol označený (hybridom myš-myš #23-57-137-1) a uložený podľa podmienok budapeštianskej zmluvy z 15. augusta 1996 v Národnom ústave biologických vied a ľudskej technológie, Agentúra priemyselnej vedy a technológie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod prístupovým číslom FERMBP-5631.

Referenčný príklad 2: Klonovanie DNA kódujúcich V oblasti myšej monoklonálnej protilátky proti ľudskému PTHrP (1 -34).

Klonovanie DNA kódujúcich V oblasti myšej monoklonálnej protilátky proti ľudskému PTHrP (1 -34), #23-57-137-1, bolo vykonané nasledujúcim spôsobom.

(1) Príprava mRNA

mRNA z hybridomu #23-57-137-1 bola pripravená pomocou súpravy Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech). Teda bunky hybridomu #23-57-137-1 boli celkom homogenizované s extrakčným pufrom a mRNA bola z neho izolovaná a vyčistená na centrifugačných stĺpcoch s oligo-dT celulózou podľa návodu priloženého k súprave. Na výslednom roztoku bolo vykonané zrážanie alkoholom, aby bola mRNA získaná vo forme zrazeniny. Zrazenina mRNA bola rozpustená v elučnom pufri.

(2) Príprava a amplifikácia cDNA génu kódujúceho V oblasť myšieho H reťazca (i) Klonovanie cDNA pre V oblasť H reťazca protilátky #23-57-137-1

Gén kódujúci V oblasť H reťazca myšej monoklonálnej protilátky proti ľudskému PTHrP bol klonovaný pomocou metódy 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol.,

Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. a kol., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989). Metóda 5'-RACE bola vykonaná pomocou súpravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONTECH), podľa návodu priloženého k súprave. Pri tomto postupe bol ako primér pre syntézu cDNA použitý primér MHC2 (SEQ ID NO: 1), ktorý je schopný hybridizovať na C oblasť myšieho H reťazca. mRNA pripravená ako bolo popísané vyššie, (asi 2 µg), ktorá bola matricou pre syntézu cDNA, bola zmiešaná s primérom MHC2 (10 pmol). Výsledná zmes reagovala s reverznou transkriptázou pri teplote 52 °C počas 30 minút, aby sa uskutočnila reverzná transkripcia mRNA na cDNA.

K výslednému reakčnému roztoku bol pridaný 6 N NaOH, aby bola hydrolyzovaná celková ostávajúca RNA (65 °C počas 30 minút) a potom bolo vykonané zrážanie alkoholom, aby bola cDNA izolovaná a vyčistená vo forme zrazeniny. Vyčistená cDNA bola na 5'konci ligovaná kAmpli FINDER Anchor (SEQ ID NO: 42) reakciou s T4 RNA ligázou pri teplote 37 °C počas 6 hodín a ďalej pri teplote miestnosti počas 16 hodín. Ako priméry pre amplifikáciu cDNA metódou PCR boli použité Anchor primér (SEQ ID NO: 2) a primér MHC-G1 (SEQ ID NO: 3) (S. T. Jones, a kol., Biotechnology, 9,88, 1991).

Roztok PCR obsahoval (na 50 µl) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 jednotky TaKaRa Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), 10 pmol Anchor primeru a 1 µl reakčnej zmesi cDNA, ku ktorej boli ligované MHC-G1 primér a Ampli FINDER Anchor primér, a cez to bol navrstvený minerálny olej (50 µl)- PCR bola vykonaná na termocykleri model 480J (Perkin Elmer) v 30 cykloch pri podmienkach: 94 °C počas 45 sekúnd; 60 °C dobu 45 sekúnd; a 72 °C počas 2 minút,

(ii) Klonovanie cDNA pre V oblasť L reťazca protilátky #23-57-137-1

Gén kódujúci V oblasť L reťazca myšej monoklonálna protilátky proti ľudskému PTHrP bol klonovaný pomocou metódy 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. a kol., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989). Metóda 5'-RACE bola vykonaná pomocou súpravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONTECH) podľa návodu priloženého k súprave. Pri

tomto postupe bol ako primér pre syntézu cDNA použitý primér oligo-dT. mRNA pripravená ako bolo popísané vyššie, (asi 2 µg), ktorá bola matricou pre syntézu cDNA, bola zmiešaná s oligo-dT primérom. Výsledná zmes reagovala s reverznou transkriptázou pri teplote 52 °C počas 30 minút, aby sa uskutočnila reverzná transkripcia mRNA na cDNA. K výslednému reakčnému roztoku bol pridaný 6 N NaOH, aby bola hydrolyzovaná celková v ňom ostávajúca RNA (65 °C počas 30 minút). Výsledný roztok bol zrážaný alkoholom, aby bola cDNA izolovaná a vyčistená vo forme zrazeniny. Takto syntetizovaná cDNA bola na 5'konci ligovaná k Ampli FINDER Anchor reakciou s T4 RNA ligázou pri teplote 37 °C počas 6 hodín a ďalej pri teplote miestnosti počas 16 hodín.

PCR primér MLČ (SEQ ID NO: 4) bol navrhnutý na základe konzervovanej sekvencie C oblasti myšieho L reťazca λ a potom syntetizovaný pomocou DNA/RNA syntetizátora model 394 (ABI). Roztok PCR obsahoval (na 100 µl) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 jednotky AmpliTaq (PERKIN ELMER), 50 pmol Anchor primér (SEQ ID NO: 2) a 1 µl reakčnej zmesi cDNA, ku ktorej boli ligované MLČ (SEQ ID NO: 4) a Ampli FINDER Anchor, a cez to bol navrstvený minerálny olej (50 µl)- PCR bola vykonaná na termocykléri model 480J (Perkin Elmer) v 35 cykloch pri podmienkach: 94 °C počas 45 sekúnd; 60 °C počas 45 sekúnd; a 72 °C počas 2 minút,

(iii) Čistenie a fragmentácia produktov PCR

Každý z DNA fragmentov amplifikovaných metódou PCR, ako bolo popísané vyššie, bol oddelený pomocou agarózovej gélovej elektroforézy na géli 3% Nu Sieve GTG agarózy (FMC Bio. Products). Ako pre V oblasť H reťazca tak pre V oblasť L reťazca bol z gélu vyrezaný segment agarózového gélu, ktorý obsahoval fragment DNA dlhý asi 550 párov báz. V každom segmente gélu bola vykonaná purifikácia fragmentu DNA, o ktorý sa jedná, pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BI0101) podľa návodu priloženého k súprave. Vyčistená DNA bola vyzrážaná etanolom a zrazenina DNA bola rozpustená v 20 µl roztoku, ktorý obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Vzorka (1 µl) roztoku DNA bola štepená reštrikčným enzýmom XmaI (New England Biolabs) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny a ďalej štepená reštrikčným enzýmom EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1

hodiny. Štepený roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a potom zrážaný etanolom, aby bola DNA získaná.

Týmto spôsobom boli získané dva fragmenty DNA obsahujúce gén kódujúce V oblasť myšieho H reťazca, respektíve V oblasť myšieho L reťazca, pričom oba mali rozpoznávaciu sekvenciu pre EcoRI na 5' konci a rozpoznávaciu sekvenciu pre XmaI na 3' konci.

EcoRI-XmaI DNA fragmenty obsahujúce gén kódujúci V oblasť myšieho H reťazca, respektíve gén kódujúci V oblasť myšieho L reťazca, boli oddelene ligované do vektoru pUC19, ktorý bol štepený EcoRI a XmaI pri teplote 16 °C počas 1 hodiny, za použitia DNA ligačnej súpravy verzie 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) podľa návodu priloženého k súprave. Časť (10 µl) ligačnej zmesi bola pridaná k 100 µl roztoku obsahujúceho kompetentné bunky E. coli JM 109 (Nippon Gene Co., Ltd.). Bunková zmes bola ponechaná stáť na ľade počas 15 minút, potom pri teplote 42 °C 1 minútu a ďalej 1 minútu na ľade. K výslednej bunkovej zmesi bolo pridané 300 µl média SOČ (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a potom boli inkubované pri teplote 37 °C počas 30 minút. Výsledný roztok buniek bol vysiaty na agarové médium LB alebo na 2xYT agarové médium (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), obsahujúce buď 100 alebo 50 µg/ml ampicilínu, 0,1 mM IPTG a 20 µg/ml X-gal, a potom inkubované pri teplote 37 °C noc. Týmto spôsobom boli pripravené transformované bunky E. coli.

Transformované bunky boli kultivované pri teplote 37 °C noc v 2 ml média LB alebo 2xYT, ktoré obsahovalo buď 100 alebo 50 µg/ml ampicilínu. Frakcie buniek boli spracované v extraktore plazmidov P1-100 (Kurabo Industries, Ltd.) alebo pomocou QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN), aby bola získaná plazmidová DNA. Plazmidová DNA bola sekvenovaná nasledujúcim spôsobom.

(4) Sekvenovanie génov kódujúcich V oblasti myšej protilátky

Nukleotidová sekvencia cDNA kódujúca oblasti nesené na plazmidoch bola

určená na DNA sekvenátore 373A (ABI; Perkin-Elmer) pomocou sekvenčnej súpravy Dye Terminátor Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Ako priméry pre sekvenovanie boli použité M13 primér M4 (Takara Shuzo Co., Ltd.) (SEQ ID NO: 5) a M13 primér RV (Takara Shuzo Co., Ltd.) (SEQ ID NO: 6), a nukleotidová sekvencia bola potvrdená v oboch smeroch.

Plazmid obsahujúci gén kódujúci V oblasť myšieho H reťazca, odvodený z hybridomu #23-57-137-1 bol označený „MBC1H04“ a plazmid obsahujúci gén kódujúci V oblasť myšieho L reťazca, odvodený z hybridomu #23-57-137-1 bol označený „MBC1L24“. Nukleotidové sekvencie (vrátane odpovedajúcich aminokyselinových sekvencií) génu kódujúceho V oblasť H reťazca, odvodenú z myšej protilátky #23-57-137-1 v plazmide MBC1H04 a génu kódujúceho V oblasť L reťazca, odvodenú z myšej protilátky #23-57-137-1 v plazmidoch MBC1H24 boli uvedené v SEQ ID NO: 57, respektíve SEQ ID NO: 65. Aminokyselinové sekvencie polypeptidov pre V oblasť H reťazca a V oblasť L reťazca boli uvedené v SEQ ID NO: 46, respektíve SEQ ID NO: 45.

Kmeň *E. coli* obsahujúci plazmid MBC1H04 a kmeň *E. coli* obsahujúci plazmid MBC1L24 boli označené „*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04)“, respektíve „*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24)“. Tieto kmene *E. coli* boli uložené podľa podmienok budapeštianskej zmluvy v Národnom ústave biologických vied a ľudskej technológie, Agentúra priemyselnej vedy a technológie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko) 15. augusta 1996 pod prístupovým číslom FERM BP-5628 pre *Escherichia coli* JM109 (MBC1H04), respektíve FERM BP-5627 pre *Escherichia coli* JM109(MBC1L24).

(5) Stanovenie CDR myšej monoklonálnej protilátky #23-57-137-1 proti ľudskému PTHrP

V oblasť H reťazca a V oblasť L reťazca boli vzájomne podobnej všeobecnej štruktúry, z nich každá má štyri podporné oblasti (FR) spojené tromi hypervariabilnými oblasťami (teda oblasťami určujúcimi komplementaritu; CDR). Aminokyselinové sekvencie FR sú relatívne dosť konzervované, zatiaľ, čo aminokyselinové sekvencie CDR majú extrémne vysokú variabilitu (Kabát, E. A. a

kol., „Sekvence imunologicky zaujímavých proteinů“, US Dept. Health and Human Services, 1983).

Podľa týchto údajov bola homológia aminokyselín medzi V oblasťami myšej monoklonálna protilátky proti ľudskému PTHrP určená s odvolaním na databázu aminokyselinových sekvencií zavedenú Kabátom a kol. Teda CDR V oblasti boli stanovené ako je ukázané v tabuľke 1.

Aminokyselinové sekvencie CDR 1 až 3 vo V oblasti L reťazca sú ukázané v SEQ ID NO: 59 až SEQ ID NO: 61; a aminokyselinové sekvencie CDR 1 až 3 vo V oblasti H reťazca sú ukázané v SEQ ID NO: 62 až SEQ ID NO: 64.

Tabuľka 1

V oblasť	SEQIDNO:	CDR1	CDR2	CDR3
V oblasť H reťazca	57	31 až 35	50 až 66	99 až 107
V oblasť L reťazca	65	23 až 34	50 až 60	93 až 105

Referenčný príklad 3: Konštrukcia chimérnej protilátky

(i) Konštrukcia V oblasti H reťazca

Pre ligovanie do expresného vektoru, nesúceho genómovú DNA C oblasti Cy1 ľudského H reťazca, boli klonované DNA kódujúce V oblasť myšieho H reťazca pozmenené pomocou PCR metódy. Spätný primér MBC1-S1 (SEQ ID NO: 7) bol navrhnutý tak, aby hybridizoval s DNA sekvenciou kódujúcou 5'oblasť vedúcej sekvencie V oblasti a aby obsahoval ako Kozákovu konvenčnú sekvenciu (Kozák, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987), tak rozpoznávaciu sekvenciu pre HindIII. Priamy primér MBC1-a (SEQ ID NO: 8) bol navrhnutý tak, aby hybridizoval s DNA sekvenciou kódujúcou 3'oblasť J oblasti a aby obsahoval ako donorovú zostrihovú

sekvenciu, tak rozpoznávaciu sekvenciu pre BamHI.

PCR reakcia bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pripojeného pufra. Roztok PCR obsahoval (na 50 µl) 0,07 µg plazmidu MBC1H04 ako DNA matricu, 50 pmol priméru MBC1-a a 50 pmol primeru MBC1-S1, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufri, cez čo bolo navrstvené 50 µl minerálneho oleja. PCR prebiehala 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 55 °C počas 1 minúty; 72 °C počas 2 minút. Tieto PCR metódou amplifikované DNA fragmenty boli oddelené pomocou agarovej gélovej elektroforézy na géli 3% Nu Sieve GTG agarósy (FMC Bio. Products).

Potom bol segment agarózového gélu, ktorý obsahoval fragment DNA dlhý 437 párov báz vyrezaný a DNA fragment bol z neho vyčistený pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BI0101) podľa návodu priloženého k súprave. Vyčistená DNA bola odoberatá pomocou zrážania etanolom a potom bola rozpustená v 20 µl roztoku, ktorý obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Vzorka (1 µl) výsledného roztoku DNA bola štepená reštrikčnými enzýmami BamHI a HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Štepený roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a potom zrážaný etanolom, aby bola získaná DNA, o ktorú sa jedná.

Získaný DNA fragment HindIII-BamHI, ktorý obsahuje gén kódujúci V oblasť myšieho H reťazca, bol klonovaný do vektoru pUC19, ktorý bol štepený HindIII a BamHI. Výsledný plazmid bol sekvenovaný na DNA sekvenátore 373A (Perkin-Elmer) pomocou primérov M13-M4 a M13-RV a sekvenčnej súpravy Dye Terminátor Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Ako výsledok bol získaný plazmid, ktorý niesol gén so správnou nukleotidovou sekvenciou, ktorá kóduje V oblasť myšieho H reťazca odvodeného z hybridomu #23-57-137-1 a mal rozpoznávaciu sekvenciu pre HindIII a Kozákovu sekvenciu v svojej 5' oblasti a rozpoznávaciu sekvenciu pre BamHI v svojej 3' oblasti, ktorý bol označený „MBC1H/pUC19“.

(ii) Konštrukcia V oblasti H reťazca pre prípravu cDNA chimérneho H reťazca typu myš-človek

Pre ligovanie s cDNA ľudskej C oblasti Cy1 H reťazca, bola DNA kódujúca V

oblasť myšieho H reťazca, konštruovaná tak ako bolo popísané vyššie, pozmenená pomocou PCR metódy. Spätný primér MBC1HVS2 (SEQ ID NO: 9) pre V oblasť bol navrhnutý tak, aby spôsobil zámenu druhej aminokyseliny (asparagínu) na sekvenciu kódujúcu prednú časť vedúcej sekvencie V oblasti H reťazca za glycín a aby obsahoval Kozákovu konvenčnú sekvenciu (Kozák, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) a rozpoznávacie sekvencie pre HindIII a BamHI. Priamy primér MBC1HVR2 (SEQ ID NO: 10) pre V oblasť H reťazca bol navrhnutý tak, aby hybridizoval s DNA sekvenciou kódujúcou 3' oblasť J oblasti, 5' oblasť C oblasti a aby obsahoval rozpoznávacie sekvencie pre ApaI a SmaI.

PCR reakcia bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pripojeného pufru. Roztok PCR obsahoval (na 50 μ l) 0,6 μ l plazmidu MBC1H/pUC19 ako DNA matricu, 50 pmol primér MBC1HVS2 a 50 pmol priméru MBC1HVR2, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufri, cez čo bolo navrstvené 50 μ l minerálneho oleja. PCR trvala 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 55 °C počas 1 minúty; 72 °C počas 1 minúty. DNA fragmenty amplifikované PCR metódou boli oddelené pomocou agarovej gélovej elektroforézy na géli 1% Sea Kem GTG agarózy (FMC Bio. Products). Potom bol segment agarózového gélu, ktorý obsahoval fragment DNA dlhý 456 párov báz vyrezaný a DNA fragment bol z neho vyčistený pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BI0101) podľa návodu priloženého k súprave. Vyčistená DNA bola vyzrážaná etanolom a potom bola rozpustená v 20 μ l roztoku, ktorý obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Výsledný DNA roztok (1 μ l) bol štepený reštrikčnými enzýmami EcoRI a SmaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Štepený roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a potom zrážaný etanolom, aby bola získaná DNA. Získaný DNA fragment EcoRI-SmaI, ktorý obsahuje gén kódujúci V oblasť myšieho H reťazca, bol klonovaný do vektoru pUC19, ktorý bol štepený EcoRI a SmaI. Výsledný plazmid bol sekvenovaný na DNA sekvenátore 373A (Perkin-Elmer) pomocou primérov M13-M4 a M13-RV a sekvenačnej súpravy Dye Terminátor Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Ako výsledok bol získaný plazmid, ktorý niesol gén so správnou nukleotidovou sekvenciou, ktorá kóduje V oblasť myšieho H reťazca odvodeného z hybridomu #23-57-137-1 a mal rozpoznávacie sekvencie pre EcoRI a

HindIII a Kozákovu sekvenciu v svojej 5' oblasti a rozpoznávacie sekvencie pre ApaI a SmaI v svojej 3' oblasti, ktorý bol označený „MBC1Hv/pUC19“.

(iii) Konštrukcia expresného vektoru pre H reťazec chimérnej protilátky

cDNA obsahujúca DNA pre C oblasť Cy1 H reťazca ľudskej protilátky bola pripravená nasledujúcim spôsobom. mRNA bola pripravená z buniek CHO, do ktorých boli vnesené ako expresný vektor DHFR-ΔE-RVh-PM-1-f (vid'. WO 92/19 759) kódujúci genómovú DNA V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky PM1 a C oblasť IgG1 H reťazca ľudskej protilátky (N. Takahashi a kol., Cell 29, 671-679, 1982), tak expresný vektor RV1-PM1a (vid'. WO 92/19 759) kódujúci genómové DNA V oblasti L reťazca zušľachtenej protilátky PM1 a C oblasť L reťazca k ľudskej protilátky. Za použitia mRNA bola pomocou RT-PCR metódy klonovaná cDNA obsahujúca V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky PM1 a C oblasť Cy1 ľudskej protilátky, potom bola vnesená do plazmidu pUC19 na mieste HindIII-BamHI. Po sekvenovaní bol plazmid, ktorý mal správnu nukleotidovú sekvenciu označený „pRVh-PM1f-cDNA“.

Expresný vektor DHFR-ΔE-RVh-PM-1-f, v ktorom ako miesto HindIII, umiestnené medzi SV40 promótorom a DHFR génom, tak EcoRI miesto, umiestnené medzi EF-1a promótorom a génom pre V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky PM1 boli odstránené, bol pripravený pre konštrukciu expresného vektoru pre cDNA, obsahujúcej gén pre V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky PM1 a gén pre C oblasť Cy1 ľudskej protilátky.

Získaný plazmid (pRVh-PM1f-cDNA) bol štepený BamHI, konce boli zarovnané pomocou Klenowho fragmentu a ďalej štepené HindIII, čím bol získaný HindIII-BamHI fragment sa zarovnanými koncami. Tento HindIII-BamHI fragment so zarovnanými koncami bol ligovaný do vyššie spomenutého expresného vektoru DHFR-ΔE-RVh-PM-1 -f s odstránenými miestami HindIII a EcoRI, ktorý bol štepený HindIII a BamHI. Tak bol konštruovaný expresný vektor RVh-PM1f-cDNA, ktorý obsahoval cDNA kódujúcu V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky PM1 a C oblasť Cy1 ľudskej protilátky.

Expresný vektor RVh-PM1f-cDNA obsahujúci cDNA kódujúcu V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky PM1 a C oblasť Cy1 ľudskej protilátky bol štepený Apal a BamHI, a bol z neho vybraný DNA fragment obsahujúci C oblasť H reťazca. Výsledný DNA fragment bol vnesený do plazmidu MBC1 Hv/pUC19, ktorý bol štepený Apal a BamHI. Takto pripravený plazmid bol označený „MBC1HcDNA/pUC19“. Tento plazmid obsahoval cDNA kódujúcu V oblasť H reťazca myšej protilátky a C oblasť Cy1 ľudskej protilátky, a mal vo svojej 5'oblasti rozpoznávacie miesta pre EcoRI a HindIII, a vo svojej 3'oblasti rozpoznávacie miesto pre BamHI.

Plazmid MBC1HcDNA/pUC19 bol štepený EcoRI a BamHI a poskytol fragment obsahujúci nukleotidovú sekvenciu kódujúcu H reťazec chimérnej protilátky. Výsledný DNA fragment bol vnesený do expresného vektoru pCOS1, ktorý bol štepený EcoRI a BamHI, čím bol získaný expresný vektor pre chimérnu protilátku, ktorý bol označený „MBC1HcDNA/pCOS1“. Tu bol expresný vektor pCOS1 konštruovaný za použitia HEF-PMh-g γ 1 (viď. WO 92/19 759) tým, že z neho boli štepením EcoRI a SmaI odstránené gény pre protilátky a potom bol ligovaný k adaptéru EcoRI-NotI-BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.).

Na prípravu plazmidu pre expresiu v bunkách CHO bol plazmid MBC1HcDNA/pUC19 štepený EcoRI a BamHI a bol získaný fragment obsahujúci gén pre H reťazec chimérnej protilátky. DNA fragment bol potom vnesený do expresného plazmidu pCHO, ktorý boli štepený EcoRI a BamHI, čím bol získaný expresný vektor pre chimérnu protilátku, ktorý bol označený „MBC1HcDNA/pCHO1“. Tu bol expresný vektor pCHO1 konštruovaný za použitia DHFR-AE-rvH-PM1-f (viď. WO 92/19 759) tým, že z neho boli štepením EcoRI a SmaI odstránené gény pre protilátky a potom bol ligovaný k adaptéru EcoRI-NotI-BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.),

(2) Konštrukcia C oblasti ľudského L reťazca

(i) Príprava klonovacieho vektora

Pre konštrukciu pUC19 vektoru obsahujúceho gén pre ľudskú C oblasť L reťazca bol pripravený pUC19 vektor s odstráneným HindIII miestom. Vektor pUC19

(2 µg) bol štepený v 20 µl reakčnom roztoku, obsahujúcom 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotiek HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Výsledný štepený roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a potom zrážaný etanolom, aby bola získaná DNA o ktorú sa jedná.

Získaná DNA sa ponechala reagovať v 50 µl reakčnom roztoku, obsahujúcom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 0,5 mM dNTP a 6 jednotiek Klenowovho fragmentu (GIBCO BRL) pri teplote miestnosti počas 20 minút, čím boli konce DNA zarovnané. Táto reakčná zmes bola extrahovaná fenolom a chloroformom a potom zrážaná etanolom, aby bola získaná DNA vektoru.

Takto získaná DNA vektoru sa ponechala reagovať v 10 µl reakčnom roztoku, obsahujúcom 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% polyetylén glykol-8000 (objem) a 0,5 jednotky T4 DNA ligázy (GIBCO BRL) pri teplote 16 °C počas 2 hodín, aby došlo k ligácii vektorovej DNA. Reakčný roztok (5 µl) bol pridaný k 100 µl roztoku obsahujúceho kompetentné bunky *E. coli* JM109 (Nippon Gene Co., Ltd.) a výsledný roztok bol ponechaný stáť na ľade počas 30 minút, pri teplote 42 °C počas 1 minúty a ďalej na ľade počas 1 minúty. K reakčnému roztoku bolo pridané kultivačné médium SOČ (500 µl) a potom bolo inkubované pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Výsledný roztok bol vysiaty na 2xYT agarové médium (obsahujúce 50 µg/ml ampicilínu), na ktoré boli aplikované X-gal a IPTG (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Press, 1989), a potom kultivované pri teplote 37 °C cez noc, čím bol získaný transformant.

Transformant bol kultivovaný pri teplote 37 °C cez noc v médiu 2xYT (20 ml), obsahujúcom 50 µg/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie kultivačného média bola izolovaná plazmidová DNA a čistená pomocou súpravy Plasmid Mini Kit (QIAGEN) podľa návodu priloženého k súprave. Vyčistený plazmid bol štepený HindIII. Plazmid u ktorého bolo potvrdené, že má odstránené miesto HindIII, bol označený „pUC19 ΔHindIII“.

(ii) Konštrukcia DNA kódujúceho C oblasť ľudského L reťazca λ

Je známe, že C oblasť ľudského L reťazca λ má aspoň štyri izotopy a to

$\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^-$, $\text{Mcg}^-\text{Ke}^-\text{Oz}^-$, $\text{Mcg}^-\text{Ke}^-\text{Oz}^+$ a $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^+$ (P. Dariavach, a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987). V EMBL databáze bolo vykonané vyhľadávanie C oblasti ľudskeho L reťazca λ , homológneho s C oblasťou myšieho L reťazca λ protilátky #23-57-137-1. Výsledkom bolo zistenie, že izotop $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^+$ L reťazca λ ľudskej protilátky (prístupové č. X 57 819) (P. Dariavach, a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) vykazoval najvyšší stupeň homológie s C oblasťou myšieho L reťazca λ protilátky #23-57-137-1, a to 64,4% homológií, pokiaľ sa jedná o sekvenciu aminokyselín a 73,4% homológií, pokiaľ sa jedná o sekvenciu nukleotidov.

Potom bol pomocou metódy PCR konštruovaný gén kódujúci C oblasť L reťazca λ ľudskej protilátky. Priméry pre PCR boli syntetizované pomocou 394 DNA/RNA syntetizátoru (ABI). Syntetizované priméry boli nasledujúce: HLAMB1 (SEQ ID NO: 11) a HLAMB3 (SEQ ID NO: 13), ktoré oba majú pozitívnu DNA sekvenciu; a HLAMB2 (SEQ ID NO: 12) a HLAMB4 (SEQ ID NO: 14), ktoré oba majú negatívnu DNA sekvenciu; pričom každý primér obsahuje komplementárne sekvencie 20 až 23 párov báz na oboch koncoch.

Vonkajšie priméry HLAMBS (SEQ ID NO: 15) a HLAMBR (SEQ ID NO: 16) mali sekvencie homologické k priméru HLAMB1, respektíve k priméru HLAMB4. HLAMBS obsahoval rozpoznávacie sekvencie pre EcoRI, HindIII a BlnI a HLAMBR obsahoval rozpoznávaciu sekvenciu pre EcoRI. V prvej PCR reakcii boli vykonané reakcie medzi HLAMB1 a HLAMB2 a medzi HLAMBS a HLAMB4. Potom čo boli reakcie ukončené, boli oba výsledné PCR produkty miešané v ekvivalentných množstvách a v druhej PCR reakcii zostavené. K reakčnej zmesi boli pridané vonkajšie priméry HLAMBS a HLAMBR. S touto reakčnou zmesou bola vykonaná tretia PCR reakcia, aby bola amplifikovaná DNA v celej dĺžke.

Každá PCR reakcia bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) podľa návodu priloženého k súprave. V prvej PCR reakcii bolo použité 100 μl každého reakčného roztoku, obsahujúceho 5 pmol HLAMB1, 0,5 pmol HLAMB2 a 5 jednotiek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) alebo reakčného roztoku, obsahujúceho 0,5 pmol HLAMB3, 5 pmol HLAMB4 a 5 jednotiek TaKaRa ExTaq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a cez to bolo prevrstvené 50 μl minerálneho oleja.

V druhej PCR reakcii bola použitá zmes oboch reakčných roztokov (každého 50 µl) a cez to bolo prevrstvené 50 µl minerálneho oleja. PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 3 cykly pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 60 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty.

V tretej PCR reakcii bol použitý reakčný roztok, ku ktorému boli pridané vonkajšie priméry HLAMBS a HLAMBR (každého 50 pmol). PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 60 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty.

S fragmentom DNA získaným v tretej PCR reakcii bola vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia (NuSieve GTG Agarose, FMC) a bol oddelený a vyčistený z gélu pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podľa návodu priloženého k súprave.

Získaný DNA fragment bol štepený v reakčnom roztoku (20 µl) obsahujúcom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl a 8 jednotiek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Reakčný roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a DNA bola získaná pomocou zrážania etanolom. DNA bola rozpustená v roztoku (8 µl) obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid pUC19 ΔHindIII (0,8 µg), pripravený ako bolo popísané vyššie, bol štepený EcoRI rovnakým spôsobom, ako bolo popísané vyššie. Štepiaci roztok bol extrahovaný zmesou fenol/chloroform a potom zrážaný etanolom, čím bol získaný štepený plazmid pUC19 ΔHindIII. Štepený plazmid sa ponechal reagovať v reakčnom roztoku (50 µl) obsahujúcom 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM MgCl₂ a alkalickou fosfatázou (E. coli C75; Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 30 minút aby došlo k defosforyzácii (teda pôsobeniu BAP) plazmidu. Reakčný roztok bol extrahovaný zmesou fenol/chloroform a DNA bola získaná pomocou zrážania etanolom. Takto získaná DNA bola rozpustená v roztoku (10 µl) obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid pUC19 Δ HindIII (1 μ l) bol po pôsobení alkalickéj fosfatázy ligovaný k vyššie získanému produktu PCR (4 μ l) pomocou ligačnej súpravy DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný plazmid bol vnesený do kompetentných buniek *E. coli* JM109 a bol získaný transformant. Transformant bol kultivovaný cez noc v médiu 2xYT (2 ml), obsahujúcom 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

V získanom plazmide bola sekvenovaná časť obsahujúca klonovanú DNA. Sekvenovanie bolo vykonané na DNA sekvenátore 373A (ABI) pomocou primérov M13-M4 a M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledkom bolo zistenie, že klonovaná DNA tam má deleciiu 12 párov báz. Plazmid bol označený „C λ Δ /pUC19“. Potom boli z dôvodu náhrady deletované časti znovu syntetizované primérom HCMLS (SEQ ID NO: 17) a HCLMR (SEQ ID NO: 18) a za použitia týchto primérov bola pomocou metódy PCR zrekonštruovaná DNA so správnou sekvenciou.

V prvej PCR reakcii bol použitý ako matrica plazmidu C λ Δ /pUC19, ktorý má deleciiu DNA, a reakcia bola vykonaná s každou súpravou primérov, ako s HLAMBS a HCLMS tak s HCLMS a HLAMB4. Produkty PCR boli vyčistené oddelene. V druhej PCR reakcii boli produkty PCR zostavené dohromady. V tretej PCR reakcii boli k produktu druhej PCR reakcie pridané vonkajšie priméry HLAMBS a HLAMB4, aby bola amplifikovaná DNA v celej dĺžke.

V prvej PCR reakcii bol použitý reakčný roztok (100 μ l) obsahujúci 0,1 μ g plazmidu C λ Δ /pUC19 ako matricu, alebo 50 pmol každého primérov HLAMBS a HCLMR alebo 50 pmol každého primérov HCLMS a HLAMB4, a 5 jednotiek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a cez to bolo prevrstvené 50 μ l minerálneho oleja. PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 60 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty.

S produktmi PCR prvej PCR reakcie, HLAMBS-HCLMR (236 párov báz) a HCLMS-HLAMB4 (147 párov báz), bola oddelene vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom gély s nízkou teplotou topenia, aby boli DNA fragmenty izolované. DNA fragmenty boli odobraté a vyčistené z gélov pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BIO101). V druhej PCR reakcii bolo použité 20 μ l reakčného roztoku obsahujúceho

40 ng každého z vyčistených fragmentov a 1 jednotka TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a cez to bolo prevrstvené 25 μ l minerálneho oleja. PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 5 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 60 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty. V tretej PCR reakcii bolo použité 100 μ l reakčného roztoku obsahujúceho 2 μ l reakčného roztoku získaného v druhej PCR reakcii, 50 pmol každého vonkajšieho priméru HLAMBS a HLAMB4, a 5 jednotiek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a cez to bolo prevrstvené 50 μ l minerálneho oleja. PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 60 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty, čím bol získaný DNA fragment dlhý 357 párov báz (tretí PCR produkt). S DNA fragmentom bola vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia, aby bol DNA fragment izolovaný. Výsledný DNA fragment bol odobratý a vyčistený z gélu pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BI0101).

Vzorka takto získaného DNA fragmentu (0,1 μ g) bola štepená EcoRI a potom klonovaná do plazmidu pUC19 Δ HindIII, na ktorý bolo predtým pôsobené alkalickou fosfatázou. Výsledný plazmid bol vnesený do kompetentných buniek E. coli JM109 a bol získaný transformant. Transformant bol kultivovaný cez noc v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčistený plazmid bol sekvenovaný na DNA sekvenátore 373A (ABI) pomocou primerov M13-M4 a M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Plazmid u ktorého bolo potvrdené, že obsahuje správnu nukleotidovú sekvenciu bez akejkoľvek delécie, bol označený „CM/pUC19“.

(iii) Konštrukcia génu kódujúceho C oblasť ľudského L reťazca K

Fragment DNA kódujúci C oblasť ľudského L reťazca K bol klonovaný z plazmidu HEF-PM1k-gk (WO 92/19 759) pomocou metódy PCR. Priamy primér HKAPS (SEQ ID NO: 19) bol navrhnutý tak, aby obsahoval rozpoznávacie sekvencie pre EcoRI, HindIII a BlnI, a spätný primér HKAPA (SEQ ID NO: 20) bol navrhnutý tak, aby obsahoval rozpoznávaciu sekvenciu pre EcoRI. Tieto priméry boli syntetizované na 394 DNA/RNA syntetizátore (ABI).

PCR reakcia bola vykonaná za použitia 100 μ l reakčného roztoku, obsahujúceho 0,1 μ g plazmidu HEF-PM1k-gk ako matrica, 50 pmol každého z primerov HKAPS a HKAPA, a 5 jednotiek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a cez to bolo prevrstvené 50 μ l minerálneho oleja. PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 60 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty, čím vznikol PCR produkt dlhý 360 párov báz. DNA fragment bol izolovaný a vyčistený pomocou elektroforézy v 3% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia a potom odobratý a vyčistený pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BI0101).

Takto získaný DNA fragment bol štepený EcoRI a potom klonovaný do plazmidu pUC19(HindIII, na ktorý bolo predtým pôsobené alkalickou fosfatázou. Výsledný plazmid bol vnesený do kompetentných buniek E. coli JM109 a bol získaný transformant.

Transformant bol kultivovaný cez noc v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčistený plazmid bol sekvenovaný na DNA sekvenátore 373A (ABI) pomocou primerov M13-M4 a M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Plazmid u ktorého bolo potvrdené, že obsahuje správnu nukleotidovú sekvenciu, bol označený „Ck/pUC19“.

(3) Konštrukcia expresného plazmidu pre L reťazec chimérnej protilátky

Bol konštruovaný expresný plazmid pre L reťazec chimérnej protilátky #23-57-137--1. Gén kódujúci V oblasť L reťazca chimérnej protilátky #23-57-137-1 bol ligovaný do HindIII-BlnI miesta (umiestneného na samom počiatku C oblasti ľudskej protilátky) každého z plazmidov CM/pUC19 a Ck/pUC19, čím boli získané pUC19 vektory obsahujúce DNA, ktoré kódujú V oblasť L reťazca protilátky #23-57-137-1 a buď C oblasť L reťazca λ respektíve C oblasť L reťazca k. Každý z výsledných vektorov bol potom štepený EcoRI, aby bol oddelený gén pre L reťazec chimérnej protilátky. Gén bol klonovaný do HEF expresného vektoru.

Teda DNA fragment kódujúci V oblasť L reťazca protilátky #23-57-137-1 bol z plazmidu MBC1L24 klonovaný pomocou PCR metódy. Priméry použité v tejto PCR metóde boli oddelene syntetizované pomocou DNA/RNA syntetizátora model 394 (ABI). Spätný primér MBCCHL1 (SEQ ID NO: 21) bol navrhnutý tak, aby obsahoval rozpoznávaciu sekvenciu HindIII a Kozákovu sekvenciu (Kozák, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) a priamy primér MBCCHL3 (SEQ ID NO: 22) bol navrhnutý tak, aby obsahoval rozpoznávacie sekvencie pre BglII a EcoRI.

PCR reakcia bola vykonaná za použitia 100 µl reakčného roztoku, obsahujúceho 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,1 µg MBC1L24, 50 pmol každého z primérov MBCCHL1 a MBCCHL3 a 1 µl AmpliTaq (PERKIN ELMER), a cez to bolo navrstvené 50 µl minerálneho oleja. PCR reakcia sa ponechala uskutočniť 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 45 sekúnd; 60 °C dobu 45 sekúnd; a 72 °C počas 2 minút.

S PCR produktom dlhým 444 párov báz bola vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia, a bol oddelený a vyčistený z gélu pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Vyčistený PCR produkt bol rozpustený v 20 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. PCR produkt (1 µl) bol štepený v 20 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 8 jednotiek HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 8 jednotiek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Štepiaci roztok bol extrahovaný zmesou fenol/chloroform a DNA o ktorú sa jedná z neho bola získaná zrážaním etanolom. DNA bola rozpustená v 8 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Rovnakým spôsobom bol plazmid pUC19 (1 µg) štepený HindIII a EcoRI, extrahovaný zmesou fenol/chloroform a potom zrážaný etanolom. Získaný štepený plazmid bol opracovaný alkalickou fosfatázou (E. coli C75; Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný reakčný roztok bol extrahovaný zmesou fenol/chloroform a DNA z neho bola získaná zrážaním etanolom. DNA bola rozpustená v 10 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid pUC19, na ktorý bolo pôsobené alkalickou fosfatázou (1 μ l), bol ligovaný s vyššie získaným PCR produktom (4 μ l) pomocou ligačnej súpravy DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný plazmid bol vnesený do kompetentných buniek *E. coli* JM109 (Nippon Gene Co., Ltd.) rovnakým spôsobom ako bolo popísané vyššie, a bol získaný transformant. Transformant bol vysiaty na agar s médiom 2xYT, obsahujúcom 50 μ g/ml ampicilínu a kultivovaný pri teplote 37 °C cez noc. Výsledný transformant bol potom kultivovaný pri teplote 37 °C cez noc v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Po určení nukleotidovej sekvencie bol plazmid, u ktorého bolo potvrdené že má správnu sekvenciu nukleotidov, označený „CHL/pUC19“.

Každý z plazmidov CM/pUC19 a Ck/pUC19 (1 μ g každého) bol štepený v 20 μ l reakčnom roztoku, ktorý obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotiek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 jednotky BlnI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Štepiaci roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a DNA z neho bola získaná pomocou zrážania etanolom. Na DNA bolo pôsobené alkalickou fosfatázou pri teplote 37 °C počas 30 minút. Reakčný roztok bol extrahovaný fenolom a chloroformom a DNA bola získaná pomocou zrážania etanolom. DNA bola rozpustená v 10 μ l roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid CHL/pUC19 (8 μ h), ktorý obsahoval DNA kódujúcu V oblasť L reťazca protilátky #23-57-137-1 bol štepený HindIII a BlnI rovnakým spôsobom, ako bolo popísané vyššie a vznikol tak DNA fragment dlhý 409 párov báz. S fragmentom DNA bola vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia a potom bol oddelený a vyčistený z gélu pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BI0101). DNA bola rozpustená v 10 μ l roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

DNA pre V oblasť L reťazca (4 μ l) bola klonovaná do 1 μ l každého z plazmidov CM/pUC19 a Ck/pUC19, na ktoré bolo predtým pôsobené alkalickou fosfatázou, a potom vnesené do kompetentných buniek *E. coli* JM109, aby bol získaný transformant. Transformant bol kultivovaný cez noc v 3 ml média 2xYT,

obsahujúceho 50 µg/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Takto pripravené dva plazmidy boli označené „MBC1L(λ)/pUC19" respektíve „MBC1L(κ)/pUC19.

Každý z plazmidov MBC1L(λ)/pUC19 a MBC1L(κ)/pUC19 bol štepený EcoRI a potom bola vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia. DNA fragment dlhý 743 párov báz bol oddelený a vyčistený z gélu pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BIO101), a potom bol rozpustený v 10 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Expresný vektor (plazmid HEF-PM^ok-gk) (2,7 µg) bol štepený EcoRI a potom extrahovaný fenolom a chloroformom a DNA z neho bola získaná pomocou zrážania etanolom. Na DNA fragment bolo pôsobené alkalickou fosfatázou a potom bola vykonaná elektroforéza v 3% agarózovom gély s nízkou teplotou topenia. DNA fragment dlhý 6561 párov báz bol z gélu izolovaný a vyčistený pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BIO101). Vyčistený DNA fragment bola rozpustený v 10 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

HEF vektor opracovaný alkalickou fosfatázou (2 µl) bol ligovaný s EcoRI fragmentom (3 µl) každého z plazmidov MBC1L(λ)/pUC19 a MBC1L(κ)/pUC19. Produkt ligácie bol vnesený do kompetentných buniek *E. coli* JM109 a bol získaný transformant. Transformant bol kultivovaný v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 µg/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčistený plazmid bol štepený v 20 µl reakčnom roztoku obsahujúcom 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotiek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 jednotky PvuI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Tato reakcia dávala štepené fragmenty dlhé 5104/2195 párov báz v prípade, že fragment bol vložený v správnej orientácii, poprípade fragmenty dlhé 4378/2926 párov báz v prípade, že fragment bol vložený v orientácii opačnej. Plazmid, u ktorého bolo potvrdené že má fragment v správnej orientácii, bol označený „MBC1 L(λ)/neo" pre plazmid MBC1L(λ)/pUC19 alebo „MBC1L(κ)/neo" pre plazmid MBC1L(κ)/pUC19.

(4) Transfekcia bunky COS-7

Aby bola zhodnotená väzobná aktivita k antigénu a neutralizačná aktivita chimérnych protilátok, boli vyššie pripravené expresné plazmidy prechodne exprimované v bunke COS-7.

Prechodná expresia chimérnych protilátok bola vykonaná za použitia všetkých kombinácií plazmidov MBC1 HcDNA/pCOS1 a MBC1 L(λ)/neo a plazmidov MBC1HcDNA/ pCOS1 a MBC1L(κ)/neo tak, že bola bunka COS-7 súčasne transfekovaná plazmidmi elektroporézovaním pomocou zariadenia Gene Pulser (Bio Rad). Teda, plazmidy (10 μ g každého) boli pridané k suspenzii buniek COS-7 (0,8 ml; 1×10^7 buniek/ml) v PBS(-). Na výsledný roztok bolo pôsobené pulzmi s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 2 μ F, ktoré spôsobili elektroporáciu. Po 10 minútovom zotavovacom období pri teplote miestnosti boli elektroporézované bunky suspendované v médiu DMEM (GIBCO), obsahujúcom 2% fetálne tel'acie sérum s ultranízkym obsahom IgG (GIBCO), a potom kultivované v 10 cm kultivačných miskách v CO₂ inkubátore. Po kultivácii 72 hodín bol z kultúr odobratý supernatant, centrifugovaný aby boli odstránené bunkové zvyšky, a použitý ako vzorka pre nasledujúce testy ELISA. Pri tomto postupe bolo čistenie chimérnej protilátky zo supernatantu kultúr buniek COS-7 vykonané pomocou súpravy AffiGel Protein A MAPSII Kit (Bio Rad) podľa návodu priloženého k súprave.

(5) ELISA

(i) Určovanie koncentrácie protilátky

Doštička testu ELISA pre určenie koncentrácie protilátky bola pripravená nasledujúcim spôsobom. Každá z 96 jamiek doštičky testu ELISA (Maxisorp, NUNC) bola potiahnutá 100 μ l pot'ahovacieho pufru (0,1 M NaHCO₃, 0,02% NaN₃), doplneného 1 μ g/ml kozej protilátky proti ľudskému IgG (TAGO) a potom bloková

200 µl riediaceho pufru [50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN₃, 1% hovädzie sérum albumín (BSA); pH 7,2]. Ku každej jamke doštičky bola pridaná vzorka sériového riedenia supernatantu z kultúr buniek COS-7, v ktorých bola každá chimérna protilátka exprimovaná, alebo bola k jamke doštičky pridaná vzorka sériového riedenia chimérnej protilátky ako takej, vo vyčistenej forme. Doštička bola inkubovaná pri teplote miestnosti počas 1 hodiny a potom premytá PBS-Tween 20. Ku každej jamke doštičky bolo pridané 100 µl roztoku kozej protilátky proti ľudskému IgG, konjugovanej a alkalickou fosfatázou (TAGO). Potom čo bola doštička inkubovaná pri teplote miestnosti počas 1 hodiny a premytá PBS-Tween 20, bol ku každej jamke doštičky pridaný roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). V roztoku bola meraná jeho absorbancia pri 405 nm pomocou odčítacieho zariadenia pre doštičky Microplate Reader (Bio Rad), aby bola zistená koncentrácia protilátky. Pri tomto meraní bol ako štandardná látka použitý čistený Hu IgG1 λ (The Binding Site).

(ii) Určovanie schopnosti viazať antigén

Doštička testu ELISA pre určenie schopnosti protilátky viazať antigén, bola pripravená nasledujúcim spôsobom. Každá z 96 jamiek doštičky testu ELISA bola potiahnutá 100 µl pot'ahovacieho pufru doplneného 1 µg/ml ľudského PTHrP (1-34) (Ústav pre výskum peptidov) a potom blokovaná 200 µl riediaceho pufru. Ku každej jamke doštičky bola pridaná vzorka sériového riedenia supernatantu z kultúr buniek COS-7, v ktorých bola každá chimérna protilátka exprimovaná, alebo bola k jamke doštičky pridaná vzorka sériového riedenia chimérnej protilátky ako takej vo vyčistenej forme. Potom čo bola doštička inkubovaná pri teplote miestnosti a premytá PBS-Tween 20, bolo ku každej jamke doštičky pridané 100 µl roztoku kozej protilátky proti ľudskému IgG, konjugovanej a alkalickou fosfatázou (TAGO). Potom čo bola doštička inkubovaná pri teplote miestnosti počas 1 hodiny a premytá PBS-Tween 20, bol ku každej jamke doštičky pridaný roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). V roztoku bola meraná jeho absorbancia pri 405 nm pomocou odpočítavacieho zariadenia pre doštičky Microplate Reader (Bio Rad).

Výsledkom bolo zistenie, že chimérne protilátky majú schopnosť viazať sa na ľudský PTHrP (1-34) a klonovaná V oblasť myšej protilátky má správnu štruktúru

(Obr. 5). Bolo tiež zistené, že nebol rozdiel v schopnosti viazať sa na PTHrP (1-34) medzi C oblasťou L reťazca λ chimérnej protilátky a C oblasťou L reťazca κ chimérnej protilátky. Preto bol L reťazec λ zušľachtenej protilátky použitý pre konštrukciu C oblasti L reťazca zušľachtenej protilátky.

(6) Získaná bunková línia CHO schopná stabilnej produkcie chimérnych protilátok

Aby bola získaná bunková línia schopná produkovať chimérne protilátky stabilne, boli vyššie pripravené expresné plazmidy vnesené do buniek CHO (DXB11).

Na získanie bunkovej línie schopnej produkovať chimérne protilátky stabilne, bola v bunkách CHO použitá každá z nasledujúcich kombinácií expresných plazmidov: MBC1HcDNA/pCHO1 a MBC1 L(λ)/neo; a MBC1HcDNA/pCHO1 a MBC1 L(κ)/neo. Bunky CHO boli súčasne transfekované plazmidmi elektroporézovaním pomocou zariadenia Gene Pulser (Bio Rad) nasledujúcim spôsobom. Expresné plazmidy boli oddelene štiepené reštrikčným enzýmom PvuI, aby boli získané lineárne DNA. Výsledné DNA boli extrahované fenolom a chloroformom a získané zrážaním etanolom. Takto pripravená plazmidová DNA bola použitá pre elektroporáciu. Teda, každý z plazmidov (10 μ g každého) bol pridaný k 0,8 ml suspenzii buniek CHO v PBS(-) (1×10^7 buniek/ml). Na výsledný roztok bolo pôsobené pulzmi s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 25 μ F. Po 10 minútovom zotavovacom čase pri teplote miestnosti boli elektroporézované bunky suspendované v médiu MEM-a (GIBCO), obsahujúcom 10% fetálneho tel'acieho séra (GIBCO). Výsledná suspenzia bola kultivovaná v troch doštičkách s 96 jamkami (Falcon) v CO₂ inkubátore. Jeden deň po tom, čo bola kultivácia začatá, bolo médium zmenené za médium selekčné [médium MEM-a bez ribonukleozidov alebo deoxyribo-nukleozidov (GIBCO), obsahujúce 10% fetálne tel'acie sérum (GIBCO) a 500 mg/ml Geneticinu (síran G418; GIBCO)]. Z kultivačného média boli vybraté bunky, do ktorých bol vnesený gén protilátky. Selekčné médium je zmenené za čerstvé. Dva týždne po výmene média boli bunky pozorované pod mikroskopom. Keď bol pozorovaný uspokojivý rast buniek, bolo určované množstvo produkovaných protilátok ELISA testom, ktorý bol popísaný vyššie. Z buniek boli vybraté tie, ktoré produkovali veľké množstvo protilátok.

Potom bol rozsah kultivácie získanej bunkovej línie, schopný stabilnej produkcie protilátok, zväčšený použitím fliaš v roleri, za použitia média MEM bez ribonukleozidov alebo deoxyribonukleozidov, obsahujúci 2% fetálneho tel'acieho séra s ultranízky obsahom IgG. Tretí a štvrtý deň kultivácie bol supernatant z kultúr odobratý a filtrovaný na 0,2 µm filtri (Millipore), aby z neho boli odstránené zvyšky buniek.

Čistenie chimérnych protilátok zo supernatantu kultúr buniek CHO bolo vykonané pomocou stĺpca POROS s proteínom A (PerSeptive Biosystems) na zariadení ConSep LC100 (Millipore), podľa návodu priloženého k súprave. Vyčistené chimérne protilátky boli použité ako vzorky na určovanie neutralizačnej aktivity a na testovanie terapeutickú účinnosti na zvieracích modeloch hyperkalcinémie. Koncentrácia a väzobná aktivita k antigénu bola u čistených chimérnych protilátok určovaná pomocou rovnakého ELISA systému, ktorý bol popísaný vyššie.

Referenčný príklad 4: Konštrukcia zušľachtenej protilátky

(1) Konštrukcia H reťazca zušľachtenej protilátky

(i) Konštrukcia V oblasti zušľachteného H reťazca

H reťazec zušľachtenej protilátky #23-57-137-1 bol pripravený technikou pripojovania CDR oblastí pomocou metódy PCR. Pre prípravu H reťazca zušľachtenej protilátky #23-57-137-1 (verzie „a“), ktorá má FR odvodené z ľudskej protilátky S31 679 (NFRB-PDB; Cuisinier, A. M. a kol., Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993), bolo použitých šesť nasledujúcich primérov: priméry na pripojenie CDR: MBC1HGP1 (SEQ ID NO: 23) a MBC1HGP3 (SEQ ID NO: 24) (oba obsahujú pozitívnu DNA sekvenciu) a MBC1HGP2 (SEQ ID NO: 25) a MBC1HGP4 (SEQ ID NO: 26) (oba obsahujú negatívnu DNA sekvenciu), pričom všetky obsahujú na oboch svojich koncoch komplementárnu sekvenciu dlhú 15 až 21 párov báz; a vonkajšie priméry: MBC1HVS1 (SEQ ID NO: 27) a MBC1HVR1 (SEQ ID NO: 28), ktoré majú homológiu k primérom pre pripojenie CDR MBC1HGP1, respektíve MBC1HGP4.

Priméry pre pripojenie CDR MBC1HGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4 boli oddelené na denaturačnom polyakrylamidovom géli s močovinou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), a extrahované z nej pomocou rozdrvenia a nasiaknutia rozpúšťadlom (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) nasledujúcim spôsobom.

Každý z primérov pre pripojenie CDR (1 nmol) bol rozdelený na 6% denaturačnom polyakrylamidovom géli, aby boli získané DNA fragmenty. Medzi výslednými DNA fragmentmi bol DNA fragment požadovanej dĺžky detekovaný pomocou ožiarenia UV na tenkej vrstve gélu oxidu kremičitého a potom z neho izolovaný metódou rozdrvenia a nasiaknutia rozpúšťadlom. Výsledná DNA bola rozpustená v 20 µl roztoku, ktorý obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Reakcia PCR bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). PCR reakčný roztok (100 µl) obsahoval v pufri 1 µl každého z vyššie uvedených primérov pre pripojenie CDR MBC1HVS1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4, 0,25 mM dNTP a 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq. PCR sa ponechala uskutočniť 5 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 55 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty. K výslednému reakčnému roztoku boli pridané vonkajšie priméry MBC1HVS1 a MBC1HVR1 (50 pmol každého). S touto reakčnou zmesou bola PCR reakcia ponechaná uskutočniť ďalších 30 cyklov za rovnakých podmienok. S takto amplifikovaným fragmentom DNA bola vykonaná elektroforéza na géli 4% Nu Sieve GTG agarózy (FMC Bio. Products).

Segment agarózy obsahujúcej DNA fragment dlhý 421 párov báz bol vyrezaný a DNA z neho bola vyčistená pomocou súpravy GENECLANII Kit (BI0101) podľa návodu pribaleného k súprave. Takto vyčistený bol vyzrážaný etanolom a potom rozpustený v 20 µl roztoku obsahujúceho 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Výsledná PCR reakčná zmes bola použitá pre klonovanie DNA fragmentu do plazmidu pUC19, ktorý bol štepený BamHI a HindIII, a potom bola určená nukleotidová sekvencia výsledného plazmidu. Plazmid, ktorý mal správnu nukleotidovú sekvenciu, bol označený „hMBCHv/pUC19“.

(ii) Konštrukcia cDNA V oblasti zušľachteného H reťazca

Pre ligovanie k cDNA C oblasti Cy1 zušľachteného H reťazca, bola DNA V oblasti zušľachteného H reťazca, konštruovaná vo vyššie popísanom kroku, pozmenená pomocou PCR metódy. Pre PCR metódu bol navrhnutý spätný primér MBC1HVS2 tak, aby hybridizoval s DNA sekvenciou kódujúcou 5'oblasť vedúcej sekvencie V oblasti a aby obsahoval Kozákovu konvenčnú sekvenciu (Kozák, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) a rozpoznávacie sekvencie pre HindIII a EcoRI; a priamy primér MBC1HVR2 bol navrhnutý tak, aby hybridizoval ako s DNA sekvenciou kódujúcou 3' oblasť J oblasti, tak s DNA sekvenciou kódujúcou 5' oblasť C oblasti a aby obsahoval rozpoznávacie sekvencie pre ApaI a SmaI.

PCR reakcia bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pripojeného pufra. Roztok PCR obsahoval 0,4 µg plazmidu hMBC1Hv/pUC19 ako DNA matricu, 50 pmol každého z primérov MBC1HVS2 a MBC1HVR2, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v puffi. PCR sa vykonávala 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 55 °C počas 1 minúty; 72 °C počas 1 minúty. Takto amplifikované DNA fragmenty boli oddelené pomocou agarovej gélovej elektroforézy na géli 3% Nu Sieve GTG agarose (FMC Bio. Products).

Segment agarózového gélu, ktorý obsahoval fragment DNA dlhý 456 párov báz bol vyrezaný a DNA fragment bol z neho vyčistený pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podľa návodu priloženého k súprave. Takto vyčistený DNA fragment bol vyzrážaný etanolom a potom bol rozpustený v 20 µl roztoku, ktorý obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Takto získaný PCR reakčný roztok bol použitý pre klonovanie DNA fragmentu do plazmidu pUC19, ktorý bol štepený reštrikčnými enzýmami EcoRI a SmaI, a potom bol výsledný plazmid sekvenovaný. Ako výsledok bol získaný plazmid, ktorý obsahoval DNA kódujúcu V oblasť myšieho H reťazca odvodenú z hybridomu #23-57-137-1, ďalej obsahoval rozpoznávacie sekvencie pre EcoRI a HindIII a Kozákovu sekvenciu v 5' oblasti, a rozpoznávacie sekvencie pre ApaI a SmaI v 3'oblasti, bol označený „hMBC1Hv/pUC19“.

(2) Konštrukcia expresného vektoru pre H reťazec zušľachtenej protilátky

Plazmid RVh-PM1f-cDNA, obsahujúci cDNA sekvenciu pre H reťazec protilátky hPM1, bol štepený Apal a BamHI, aby bol získaný DNA fragment obsahujúci DNA, ktorá kóduje C oblasť H reťazca. DNA fragment bol vnesený do plazmidu hMBC1Hv/pUC19, ktorý bol štepený Apal a BamHI. Získaný plazmid bol označený „hMBC1HcDNA/pUC19“. Tento plazmid obsahoval ako DNA kódujúcu V oblasť H reťazca zušľachtenej protilátky #23-57-137-1, tak DNA kódujúce C oblasť Cy1 ľudského H reťazca, a mal rozpoznávacie sekvencie pre HindIII a EcoRI vo svojej 5' oblasti a rozpoznávaciu sekvenciu pre BamHI vo svojej 3' oblasti. Nukleotidová sekvencia a jej zodpovedajúca aminokyselinová sekvencia zušľachteného H reťazca verzie „a“, nesená na plazmide hMBC1HcDNA/pUC19, sú ukázané v SEQ ID NO: 58, respektíve SEQ ID NO: 56.

Plazmid hMBC1HcDNA/pUC19 bol štepený EcoRI a BamHI, čím bol získaný DNA fragment obsahujúci DNA, ktorá kóduje H reťazec. DNA fragment bol vnesený do expresného plazmidu pCOS1, ktorý bol štepený EcoRI a BamHI. Ako výsledok bol získaný expresný plazmid pre zušľachtenú protilátku, ktorý bol označený „hMBC1HcDNA/pCOS1“.

Aby bol pripravený plazmid používaný na exprimovanie v bunkách CHO, bol plazmid hMBC1HcDNA/pUC19 ktorý bol štepený EcoRI a BamHI, čím bol získaný DNA fragment, ktorý obsahuje DNA kódujúcu H reťazec. DNA fragment bol vnesený do expresného plazmidu pCOS1, ktorý bol štepený EcoRI a BamHI. Ako výsledok bol získaný expresný plazmid pre zušľachtenú protilátku, ktorý bol označený „hMBC1HcDNA/pCOS1“.

(2) Konštrukcia V oblasti hybridného L reťazca

(i) Príprava hybridnej protilátky FR1,2/FR3,4

Bol konštruovaný gén pre FR hybridného L reťazca, ktorý má ako FR oblasti zo zušľachtenej protilátky tak FR z myšej (chimérnej) protilátky, a každá oblasť bola z hľadiska zušľachtenia zhodnotená. V tomto kroku bola za využitia reštrikčného

miesta pre AflII, umiesteného v CDR2, pripravená hybridná protilátka, ktorá má obe FR1 a FR2 odvodené z ľudskej protilátky a obe FR3 a FR4 má odvodené z myšej protilátky.

Plazmidy MBC1L(λ)/neo a hMBC1L(λ)/neo (10 μ g každého) boli oddelene štepené v 100 μ l reakčného roztoku, obsahujúceho 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% (hmotnosť/objem) BSA a 10 jednotiek AflII (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. V reakčnom roztoku bola vykonaná elektroforéza v 2% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia, čím boli z plazmidu MBC1L(λ)/neo získané DNA fragmenty dlhé 6282 párov báz (označené ako „c1“) a 1022 párov báz (označené ako „c2“) alebo DNA fragmenty dlhé 6282 párov báz (označený ako „h1“) a 1022 párov báz (označené ako „h2“) z plazmidu hMBC1L(λ)/neo. Tieto DNA fragmenty boli oddelené a vyčistené z gélu pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BIO101).

Každý z fragmentov c1 a h1 (1 μ g každého) bol opracovaný alkalickou fosfatázou. DNA fragment bol extrahovaný fenolom a chloroformom, získaný zrážaním etanolom a potom rozpustený v 10 μ l roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

DNA fragmenty c1 a h1 opracované alkalickou fosfatázou (1 μ l každého) boli ligované s h2 DNA fragmentom, respektíve c2 DNA fragmentom (4 μ l každého), (pri teplote 4 °C cez noc). Každý z ligačných produktov bol vnesený do kompetentnej bunky E. coli JM109, aby vznikol transformant. Transformant bol kultivovaný v 2 ml média 2xYT, obsahujúcom 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie kultivačného média bol plazmid vyčistený pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčistený plazmid bol štepený v 20 μ l reakčnom roztoku, obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, a buď 2 jednotky ApaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) alebo 8 jednotiek BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.), pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Bolo očakávané, že pokiaľ budú c1-h2 správne spojené, touto štepiacou reakciou by vznikli fragmenty dlhé 5560, 1246 a 598 párov báz (v prípade štepenia pomocou ApaI) alebo fragmenty dlhé 7134 a 269 párov báz (v prípade štepenia pomocou BamHI/HindIII). Na základe tohoto očakávania boli určované požadované

plazmidy.

Expresný vektor kódujúci L reťazec hybridnej protilátky ľudskej FR1,2/myšej FR3,4 bol označený „h/mMBC1L(λ)/neo". Na druhej strane, pretože nemohol byť získaný klon pre h1-c1, bola vykonaná rekombinácia do pUC vektora a potom bol výsledný rekombinantný produkt klonovaný do HEF vektora. Pri tomto postupe bol ako matrica použitý plazmid hMBC1La λ /pUC19, ktorý obsahoval DNA kódujúce V oblasť L reťazca zušľachtenej protilátky bez akýchkoľvek aminokyselinových zámien, a plazmid hMBC1Ld λ -pUC19, obsahoval DNA kódujúcu V oblasť L reťazca zušľachtenej protilátky s aminokyselinovou zmenou v pozícii 91. aminokyseliny, kde bol tyrozín v FR3 (teda 87. aminokyselina podľa Kabátovho pravidla) zamenený za izoleucín.

Plazmidy MBC1 L(λ)/pUC19, hMBC1La λ /pUC19 a hMBC1Ld λ /pUC19 (10 μ l každého) boli oddelene štepené v 30 μ l reakčnom roztoku, obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% (hmotnosť/objem) BSA, 16 jednotiek HindIII a 4 jednotky AflII, pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. S reakčnými roztokmi boli oddelene vykonané elektroforézy v 2% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia, čím bol z plazmidu MBC1L(λ)/pUC19 získaný DNA fragment dlhý 215 párov báz (označený ako „c2") a z oboch plazmidov hMBC1La λ /pUC19 a hMBC1Ld λ /pUC19 bol získaný DNA fragment dlhý 3218 párov báz (označený ako „ha1", respektíve „hd1"). Tieto DNA fragmenty boli odobraté a vyčistené pomocou súpravy GENECLAN II Kit (BIO101).

Každý z ha' a hd' fragmentov bol ligovaný s c2' fragmentom a potom vnesený do komplementárnych buniek E. coli JM109, a tak pripravený transformant. Transformant bol kultivovaný v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie kultivačného média bol izolovaný plazmid pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) Plasmid Mini Kit (QIAGEN). Takto pripravené plazmidy boli označené „m/hMBC1La λ /pUC19" pre plazmid obsahujúci fragment ha', a „m/hMBC1Ld λ /pUC19" pre plazmid obsahujúci fragment hd1'.

Každý z plazmidov m/hMBC1La λ /pUC19 a m/hMBC1Ld λ /pUC19 bol štepený EcoRI. S DNA fragmentom dlhým 743 párov báz bola vykonaná elektroforéza v 2%

agarózovom géli s nízkou teplotou topenia, a bol oddelený a vyčistený z gélu pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Výsledný DNA fragment bol rozpustený v 20 µl roztoku obsahujúcom 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Každý z DNA fragmentov (4 µl každého) bol ligovaný do vektoru HEF (1 µl), opracovaného alkalickou fosfatázou, ktorého príprava bola popísaná vyššie. Ligačný produkt bol vnesený do kompetentných buniek *E. coli* JM109, aby vznikol transformant. Transformant bol kultivovaný v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 µg/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie kultivačného média bol plazmid vyčistený pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Každý z vyčistených plazmidov bol štepený v 20 µl reakčnom roztoku, ktorý obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotiek HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 jednotky PvuI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Bolo očakávané, že pokiaľ bude DNA fragment vložený do plazmidu v správnej orientácii, touto štepiacou reakciou by vznikli fragmenty dlhé 5104 a 2195 párov báz, zatiaľ, čo pokiaľ bude DNA fragment vložený do plazmidu v orientácii opačnej, touto štepiacou reakciou by vznikli fragmenty dlhé 4378 a 2926 párov báz. Na základe tohto očakávania bola DNA plazmidu určovaná. Takto získané plazmidy boli expresné vektory kódujúce L reťazec hybridnej protilátky myšej FR1,2/ľudskej FR3,4, ktoré boli označené ako expresné vektory „m/hMBC1La/neo“, respektíve „m/-hMBC1Ld/neo“.

(ii) Príprava hybridnej protilátky FR1/FR2

Hybridná protilátka FR1/FR2 bola pripravená rovnakým spôsobom, ako bolo napísané vyššie, za použitia reštrikčného miesta SnaBI, nachádzajúceho sa v CDR1.

Plazmidy MBC1 L(λ)/neo a h/mMBC1 L(λ)/neo (10 µg každého) boli oddelene štepené v 20 µl reakčného roztoku, obsahujúceho 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% (hmotnosť/objem) BSA a 6 jednotiek SnaBI (Takara Shuzo Co., Ltd.) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Výsledný reakčný roztok bol ďalej štepený v 50 µl reakčného roztoku, obsahujúceho 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 0,01% (hmotnosť/objem) BSA a 6 jednotiek

Pvull pri teplote 37 °C počas 1 hodiny.

Vo výsledných reakčných roztokoch bola vykonaná elektroforéza v 1,5% agarózovom géli s nízkou teplotou topenia, čím boli z plazmidu MBC1L(λ)/neo získané DNA fragmenty dlhé 4955 párov báz (m1) a 2349 párov báz (m2) a DNA fragmenty dlhé 4955 párov báz (hm1) a 2349 párov báz (hm2) z plazmidu h/mMBC1L(λ)/neo. Tieto DNA fragmenty boli oddelené a vyčistené z gélu pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Každý z fragmentov bol rozpustený v 40 μ l roztoku obsahujúceho 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Fragmenty m1 a hm1 (1 μ l každého) boli ligované s fragmentmi hm2, respektíve m2 (4 μ l každého). Každý z výsledných ligačných produktov bol vnesený do kompetentnej bunky *E. coli* JM109, aby vznikol transformant. Získaný transformant bol kultivovaný v 2 ml média 2xYT, obsahujúceho 50 μ g/ml ampicilínu. Z bunkovej frakcie kultivačného média bol plazmid vyčistený pomocou súpravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Každý z vyčistených plazmidov bol štepený v 20 μ l reakčného roztoku, obsahujúceho 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, a buď 8 jednotiek Apal (Takara Shuzo Co., Ltd.) alebo 2 jednotky ApaLI (Takara Shuzo Co., Ltd.), pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Bolo očakávané, že pokiaľ budú fragmenty ligované správne, touto štepiaci reakciou by vznikol fragment dlhý 7304 párov báz (v prípade štepenia pomocou Apal) alebo fragmenty dlhé 5560, 1246 a 498 párov báz (v prípade štepenia pomocou ApaLI) pre m1-hm2, a fragmenty dlhé 6538 a 766 párov báz (v prípade štepenia pomocou Apal) alebo fragmenty dlhé 3535, 2025, 1246 a 498 párov báz (v prípade štepenia pomocou ApaLI) pre hm1-m2. Na základe tohoto očakávania boli plazmidy určované. Ako výsledok bol získaný expresný vektor kódujúci L reťazec hybridnej protilátky ľudskej FR1/myšej FR2,3,4 (označený „hmmMBC1L(λ)/neo“) a expresný vektor kódujúci L reťazec hybridnej protilátky myšej FR1/ľudskej FR2/myšej FR3,4 (označený „mhmmBd L(λ)/neo“).

(4) Konštrukcia L reťazca zušľachtenej protilátky

L reťazec zušľachtenej protilátky #23-57-137-1 bol pripravený technikou

pripojovania CDR oblasti pomocou metódy PCR. Pre prípravu 1. reťazca zušľachtenej protilátky #23-57-137-1 (verzia „a“), ktorá obsahuje FR1, FR2 a FR3 odvodené z ľudskej protilátky HSU 03 838 (GEN-BANK, Deftos, M. a kol., Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) a FR4 odvodenú z ľudskej protilátky S 25 755 (NBRF-PDB), bolo použitých šesť primérov.

Šesť primérov bolo nasledujúcich: priméry pre pripojenie CDR MBC1LGP1 (SEQ ID NO: 29) a MBC1LGP3 (SEQ ID NO: 30), oba obsahujúce pozitívnu DNA sekvenciu, priméry pre pripojenie CDR MBC1LGP2 (SEQ ID NO: 31) a MBC1LGP4 (SEQ ID NO: 32), oba obsahujú negatívnu DNA sekvenciu, pričom všetky obsahujú na oboch svojich koncoch komplementárnu sekvenciu dlhú 15 až 21 párov báz; a vonkajšie priméry: MBC1LVS1 (SEQ ID NO: 33) a MBC1LVR1 (SEQ ID NO: 34), ktoré majú homológiu k primérom pre pripojenie CDR MBC1LGP1, respektíve MBC1LGP4.

Priméry pre pripojenie CDR MBC1LGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4 boli oddelené na denaturačnom polyakrylamidovom géli s močovinou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), a extrahované z nej pomocou rozdrvenia a nasiaknutia rozpúšťadlom (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Každý z primérov pre pripojenie CDR (1 nmol každého) bol rozdelený na 6% denaturačnom polyakrylamidovom géli. Určenie DNA fragmentu požadovanej dĺžky bolo vykonané pomocou ožiarenia UV na tenkej vrstve gélu oxidu kremičitého.

Požadovaný DNA fragment bol potom z neho izolovaný metódou rozdrvenia a nasiaknutia rozpúšťadlom. Odberaný DNA fragment bol rozpustený v 20 μ l roztoku, ktorý obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Reakcia PCR bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pripojeného pufra. PCR reakčný roztok obsahoval (na 100 μ l) 1 μ l každého z vyššie uvedených primérov pre pripojenie CDR MBC1LGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4, 0,25 mM dNTP a 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq v pufri.

PCR sa ponechala uskutočniť 5 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 55 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty. K výslednej reakčnej zmesi bolo pridané 50 pmol každého z vonkajších primérov MBC1LVS1 a MBC1LVR1. S touto reakčnou zmesou bola PCR reakcia ponechaná uskutočniť ďalších 30 cyklov za rovnakých podmienok. S takto amplifikovaným fragmentom DNA bola vykonaná elektroforéza na géli 3% Nu Sieve GTG agarózy (FMC Bio. Products).

Segment agarózy obsahujúci DNA fragment dlhý 421 párov báz bol vyrezaný a DNA fragment z neho bol vyčistený pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podľa návodu priloženého k súprave. Takto získaná PCR reakčná zmes bola použitá pre klonovanie DNA fragmentu do plazmidu pUC19, ktorý bol štepený BamHI a HindIII. Výsledný plazmid bol sekvenovaný. Takto pripravený plazmid bol označený „hMBCL/pUC19“. V tomto plazmide však bola zamenená aminokyselina na 104. pozícii (odpovedajúcej 96. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) v CDR zamenená arginínom. Pre opravu tejto aminokyseliny na tyrozín bol navrhnutý a syntetizovaný opravný primér MBC1LGP10R (SEQ ID NO: 35). PCR reakcia bola vykonaná za použitia TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pripojeného pufra. PCR reakčný roztok obsahoval (na 100 µl) 0,6 µg plazmidu hMBCL/pUC19 ako DNA matricu, 50 pmol každého z primérov MBC1LVS1 a MBC1LGP10R, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 0,25 mM dNTP v pufri, cez čo bol prevrstvený minerálny olej (50 µl). PCR uskutočnila 30 cyklov pri podmienkach: 94 °C počas 1 minúty; 55 °C počas 1 minúty; a 72 °C počas 1 minúty. Takto amplifikovaný DNA fragment bol oddelený pomocou agarovej gélovej elektroforézy na géli 3% Nu Sieve GTG agarose (FMC Bio. Products).

Segment agarózového gélu, ktorý obsahoval fragment DNA dlhý 421 párov báz bol vyrezaný a DNA fragment bol z neho vyčistený pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podľa návodu priloženého k súprave. Takto pripravená PCR reakčná zmes bola použitá pre klonovanie DNA fragmentu do plazmidu pUC19, ktorý bol štepený reštrikčnými enzýmami BAMHI a HindIII.

Plazmid bol sekvenovaný pomocou primérov M13-M4 a M13-RV. Ako výsledok bolo potvrdené, že plazmid mal správnu sekvenciu. Plazmid bol potom štepený reštrikčnými enzýmami HindIII a BlnI, a DNA fragment dlhý 416 párov báz bol

oddelený pomocou elektroforézy v 1 % agarózovom géli. DNA fragment bol vyčistený pomocou súpravy GENE CLEAN II Kit (BI0101) podľa návodu priloženého k súprave, a potom vložený do plazmidu CM/pUC19, ktorý bol štepený reštrikčnými enzýmami HindIII a BlnI. Výsledný plazmid bol označený „hMBC1La/pUC19“. Tento plazmid bol štepený EcoRI, aby bol získaný DNA fragment, kódujúci zušľachtený L reťazec. DNA fragment bol vložený do plazmidu pCOS1 tak, že iniciačný kodón zušľachteného L reťazca bol umiestnený po smere vzhľadom k promótoru EF1a. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1La/pCOST“. DNA sekvencia (vrátane zodpovedajúcej aminokyselinovej sekvencie) zušľachteného L reťazca verzie „a“ je ukázaná v SEQ ID NO: 66. Aminokyselinová sekvencia verzie „a“ je tiež uvedená v SEQ ID NO: 47.

Zušľachtený L reťazec verzie „b“ bol pripravený pomocou mutagenézy vykonanej metódou PCR. Verzia „b“ bola navrhnutá tak, že vo verzii „a“ bola aminokyselina glycín na 43. pozícii (zodpovedajúcej 43. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) zamenená za prolín a aminokyselina lyzín na 49. pozícii (zodpovedajúcej 49. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) bola zamenená za kyselinu asparágovú. PCR reakcia bola vykonaná za použitia plazmidu hMBC1La/pUC19 ako matrice, mutagénneho priméru MBC1LGP5R (SEQ ID NO: 36) a primérov MBC1LVS1. Získaný DNA fragment bol štepený BamHI a HindIII, a štepený fragment bol klonovaný do BamHI-HindIII miesta pUC19. Po sekvenovaní bol plazmid štepený HindIII a AflII a výsledný štepený fragment bol ligovaný do plazmidu hMBC1La/pUC19, ktorý bol štepený HindIII a AflII.

Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1Lb/pUC19“. Tento plazmid bol štepený EcoRI, aby bol získaný DNA fragment, ktorý obsahuje DNA kódujúcu zušľachtený L reťazec. DNA fragment bol vložený do plazmidu pCOS1 tak, že iniciačný kodón zušľachteného L reťazca bol umiestnený po smere vzhľadom k promótoru EF1a. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1Lb/pCOS1“.

Zušľachtený L reťazec verzie „c“ bol pripravený pomocou mutagenézy vykonanej metódou PCR. Verzia „c“ bola navrhnutá tak, že bola aminokyselina serín na 84. pozícii (zodpovedajúcej 80. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) zamenená za prolín. PCR reakcia bola vykonaná za použitia plazmidu hMBC1La/pUC19 ako matrice, mutagénneho priméru MBC1LGP6R (SEQ ID NO: 37) a

priméru M13-RV. Získaný DNA fragment bol štepený BamHI a HindIII, a klonovaný do pUC19, ktorý bol štepený BamHI a HindIII.

Po sekvenovaní bol plazmid štepený BstPI a Aor51HI a výsledný štepený fragment bol ligovaný do plazmidu hMBC1La/pUC19, ktorý bol štepený BstPI a Aor51HI. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1LC/pUC19“. Tento plazmid bol štepený EcoRI, aby bol získaný DNA fragment, ktorý obsahuje DNA kódujúcu zušľachtený L reťazec. DNA fragment bol vložený do EcoRI miesta plazmidu pCOS1 tak, že iniciačný kodón zušľachteného L reťazca bol umiestnený po smere vzhľadom k promotoru EF1a. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1Lc/pCOS1“.

Zušľachtené L reťazce verzií „d“, „e“ a „f“ boli tiež pripravené pomocou mutagenézy vykonanej metódou PCR. Verzie „d“, „e“ a „f“ boli navrhnuté tak, že vo verziách „a“, „b“, respektíve „c“ bola aminokyselina tyrozín na 91. pozícii (zodpovedajúcej 87. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) zamenená za izoleucín. Pre každú z verzií „d“, „e“ a „f“ bola PCR reakcia vykonaná za použitia jednotlivých plazmidov hMBC1La/pCOS1 (pre verziu „d“), hMBC1 Lb/pCOS1 (pre verziu „e“), respektíve hMBC1 Lc/pCOS1 (pre verziu „f“) ako matrica, mutagénneho priméru MBC1LGP11R (SEQ ID NO: 38) a primérom M-S1 (SEQ ID NO: 44). Získaný DNA fragment bol štepený BamHI a HindIII, a klonovaný do pUC19, ktorý bol štepený BamHI a HindIII. Po sekvenovaní bol plazmid štepený HindIII a BlnI a výsledný štepený fragment bol ligovaný do plazmidu CM/pUC19, ktorý bol štepený HindIII a BlnI.

Takto získané plazmidy boli označené „hMBC1Ld/pUC19“ (pre verziu „d“), „hMBC1Le/pUC19“ (pre verziu „e“) a „hMBC1Lf/pUC19“ (pre verziu „f“). Každý z týchto plazmidov bol štepený EcoRI, aby bol získaný DNA fragment, ktorý obsahuje DNA kódujúcu zušľachtený L reťazec. DNA fragment bol vložený do EcoRI miesta plazmidu pCOS1 tak, že iniciačný kodón zušľachteného L reťazca bol umiestnený po smere vzhľadom k EF1a promótoru v plazmide. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1Ld/pCOS1“ (pre verziu „d“), „hMBC1Le/pCOS1“ (pre verziu „e“) a „hMBC1Lf/pCOS1“ (pre verziu „f“).

Zušľachtené L reťazce verzií „g“ a „h“ boli tiež pripravené pomocou

mutagenézy vykonanej metódou PCR. Verzie „g” a „h” boli navrhnuté tak, že vo verziách „a” respektíve „d” bola aminokyselina histidín na 36. pozícii (zodpovedajúcej 36. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) zamenená za tyrozín. PCR reakcia bola vykonaná za použitia mutagénneho priméru MBC1LGP9R (SEQ ID NO: 39), priméru M13-RV a plazmidu hMBC1La/pUC19 ako matrice. Ďalšia PCR bola vykonaná za použitia takto získaného PCR produktu a proteínu M13-M4 a plazmidu hMBC1La/pUC19 ako matrice. Získaný DNA fragment bol štepený HindIII a BlnI, a potom klonovaný do plazmidu C/pUC19, ktorý bol štepený HindIII a BlnI. Za použitia tohoto plazmidu ako matrice, bola vykonaná PCR reakcia za použitia primérov MBC1LGP13R (SEQ ID NO: 40) a MBC1LVS1. Získaný DNA fragment bol štepený ApaI a HindIII, a potom vložený buď do každého z plazmidu hMBC1La/pUC19 a hMBC1Ld/pUC19, ktoré boli štepené ApaI a HindIII. Získané plazmidy boli sekvenované. Plazmidy u ktorých bolo potvrdené, že obsahujú správnu sekvenciu boli označené „hMBC1Lg/pUC19” (pre verziu „g”) a hMBC1Lh/pUC19 (pre verziu „h”). Každý z týchto plazmidov bol štepený EcoRI, aby bol získaný fragment obsahujúci DNA, ktorá kóduje zušľachtený L reťazec. DNA fragment bol vložený do EcoRI miesta plazmidu pCOS1 tak, že iniciačný kodón zušľachteného L reťazca bol umiestnený po smere vzhľadom k EF1a promótoru. Takto získané plazmidy boli označené „hMBC1Lg/pCOS1” (pre verziu „g”) a „hMBC1Lh/pCOS1” (pre verziu „h”).

Zušľachtené L reťazce verzií „i”, „j”, „k”, „l”, „m”, „n” a „o” boli tiež pripravené pomocou mutagenézy vykonanej metódou PCR. PCR reakcia bola vykonaná za použitia plazmidu hMBC1La/pUC19 ako matrice, mutagénneho priméru MBC1LGP14S (SEQ ID NO: 41) a priméru V1RV(A) (SEQ ID NO: 43). Výsledný DNA fragment bol štepený ApaI a BlnI, a potom klonovaný do plazmidu hMBC1Lg/pUC19, ktorý bol štepený ApaI a BlnI. Získané plazmidy boli sekvenované a bol vybratý klon, do ktorého bola vnesená mutácia pre každú verziu. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1Lx/pUC19” (x=i, j, k, l, m, n alebo o). Tento plazmid bol štepený EcoRI, aby bol získaný fragment obsahujúci DNA, ktorá kóduje zušľachtený L reťazec. DNA fragment bol vložený do EcoRI miesta plazmidu pCOS1 tak, že iniciačný kodón zušľachteného L reťazca bol umiestnený po smere vzhľadom k EF1a promótoru. Takto získaný plazmid bol označený „hMBC1Lx/pCOSr” (x=i, j, k, l, m, n alebo o). DNA sekvencia (vrátane odpovedajúcich

aminokyselinových sekvencií) verzií „j“, „l“, „m“, „n“ a „o“ sú uvedené v SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 respektíve SEQ ID NO: 70. Aminokyselinové sekvencie týchto verzií sú tiež uvedené v SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 respektíve SEQ ID NO: 51.

Zušľachtené L reťazce verzií „p“, „q“, „r“, „s“ a „t“ navrhnuté tak, že vo verziách „i“, „j“, „rn“, „l“ respektíve „o“ bola aminokyselina histidín na 87. pozícii (tyrozín) zamenená za izoleucín. Tieto verzie boli pripravené za využitia reštrikčného miesta Aor51MI v FR3 a zamenením tohoto miesta v každej z verzií „i“, „j“, „m“, „l“ alebo „o“ miestom, ktoré sa nachádza vo verzii „h“. Teda reštrikčný fragment Aor51HI (514 párov báz), obsahujúci CDR3, časť FR3 a celú FR4, bol odstránený z expresného plazmidu „hMBCILxV-pCOST (x=i, j, m, l alebo o). Na miesto odstráneného fragmentu bol ligovaný reštrikčný fragment Aor51HI (514 párov báz) z expresného plazmidu hMBC1LhV/pCOS1, ktorý obsahuje CDR3, časť FR3 a celú FR4 tak, že aminokyselina tyrozín na 91. pozícii (zodpovedajúcej 87. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) bola zamenená za izoleucín. Výsledný plazmid boli sekvenovaný. Od každej verzie „i“, „j“, „m“, „l“ a „o“ bol izolovaný klon u ktorého bola aminokyselina tyrozín na 91. pozícii (zodpovedajúcej 87. aminokyseline podľa Kabátovho pravidla) bola zamenená za izoleucín. Tieto modifikované verzie plazmidov, zodpovedajúci verziám „i“, „j“, „m“, „l“, respektíve „o“ boli označené ako verzie „p“, „q“, „s“, „r“, respektíve „t“. Získané plazmidy boli označené hMBC1 LxV/pCOS1 (x=p, q, s, r alebo t). DNA sekvencie (vrátane zodpovedajúcich aminokyselinových sekvencií) verzií „q“, „r“, „s“, respektíve „t“ sú uvedené v SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 respektíve SEQ ID NO: 74. Aminokyselinové sekvencie týchto verzií sú tiež uvedené v SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 respektíve SEQ ID NO: 55.

Plazmid hMBC1 LV/pCOS1 bol štiepený HindIII a EcoRI a potom klonovaný do plazmidu pUC19, ktorý bol štiepený HindIII a EcoRI. Takto získaný plazmid bol „hMBC1LqV/pUC19“.

Pozície zamenených aminokyselín v jednotlivých verziách zušľachteného L reťazca sú uvedené ďalej v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Pozície zamenenej aminokyseliny v sekvencii (aminokyseliny sú číslované podľa Kabátovho pravidla)

Verz	36	43	45	47	49	80	87
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

V tabuľke 2 predstavujú veľké písmená nasledujúce aminokyseliny: Y: tyrozín; P: prolín; K: lyzín; V: valín; D: kyselina asparagová; a I: izoleucín.

Kmene *E. coli*, z ktorých každý obsahuje plazmidy hMBC1HcDN/pUC19 a hMBC1Lq/pUC19 boli označené „*Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDN/pUC19)“, respektíve „*Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq/pUC19)“, a boli uložené podľa podmienkach budapeštianskej zmluvy z 15. augusta 1996 v Národnom ústave biologických vied a ľudskej technológie, Agentúra priemyslovej vedy a technológie,

Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod prístupovými číslami FERM BP-5629 pre *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) a FERM BP-5630 pre *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq/pUC19).

(5) Transfekcia buniek COS-7

Aby bola zhodnotená väzobná aktivita k antigénu a neutralizačné aktivity hybridných protilátok a zušľachtených protilátok #23-57-137-1, bol vyššie pripravený expresný plazmid prechodne exprimovaný v bunkách COS-7. Pre prechodnú expresiu L reťazca hybridných protilátok, boli bunky COS-7 súčasne transfekované elektroporézovaním pomocou zariadenia Gene Pulser (Bio Rad) každou z nasledujúcich kombinácií plazmidov: hMBC1HcDNA/pCOS1 a h/mMBC1L(λ)/neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a m/hMBC1La/neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a m/hMBC1Ld/neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a h/mMBd L(λ)/neo; a hMBC1HcDNA/pCOS1 a mhmMBd L(λ)/neo. Teda, k suspenzii (0,8 ml) buniek COS-7 v PBS(-) (1×10^7 buniek/ml) bola pridaná každá kombinácia plazmidovej DNA. Na výsledný roztok bolo pôsobené pulzmi s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 25 μ F. Po 10 minútovom zotavovacom čase pri teplote miestnosti boli elektroporézované bunky suspendované v médiu DMEM, obsahujúcom 2% fetálneho tel'acieho séra s ultranízkym obsahom IgG (GIBCO), a potom kultivované v 10 cm kultivačných miskách v CO₂ inkubátore. Po kultivácii 72 hodín bol z kultúr odobratý supernatant a centrifugovaný, aby z neho boli odstránené bunkové zvyšky. Takto pripravený roztok bol použitý ako vzorka na test ELISA, popísaný ďalej.

Na prechodnú expresiu zušľachtených protilátok #23-57-137-1 boli bunky COS-7 súčasne transfekované elektroporézovaním pomocou zariadenia Gene Pulser (Bio Rad) každé plazmidmi hMBC1HcDNA/pCOS1 a hMBC1Lx/pCOS (x=a až t) rovnakým spôsobom, ako bolo popísané vyššie pre hybridné protilátky. Supernatanty z kultúr boli spracované a použité v testu ELISA, popísanom ďalej.

Čistenie hybridných protilátok a zušľachtených protilátok zo supernatantov kultúr buniek COS-7 bolo vykonané pomocou súpravy AffiGel Protein A MAPSII Kit (Bio Rad), podľa návodu priloženého k súprave.

(6) ELISA test

(i) Určovanie koncentrácie protilátky

Doštička testu ELISA pre určenie koncentrácie protilátky bola pripravená nasledujúcim spôsobom. Každá z 96 jamiek doštičky testu ELISA (Maxisorp, NUNC) bola potiahnutá 100 μ l pot'ahovacieho pufru (0,1 M NaHCO_3 , 0,02% NaN_3), doplneného 1 μ g/ml kozej protilátky proti ľudskému IgG (TAGO) a potom blokovaná 200 μ l riediaceho pufru [50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl_2 , 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN_3 , 1% hovädzie sérum albumín (BSA); pH 7,2]. Ku každej jamke doštičky bol pridaná vzorka sériového riedenia supernatantu z kultúr buniek COS, v ktorých boli jednotlivé hybridné protilátky a zušľachtené protilátky exprimované, alebo bola k jamke doštičky pridaná vzorka sériového riedenia jednotlivých hybridných protilátok a zušľachtených protilátok vo vyčistenej forme. Doštička bola inkubovaná pri teplote miestnosti počas 1 hodiny a potom premytá PBS-Tween 20. Ku každej jamke doštičky bolo pridané 100 μ l roztoku kozej protilátky proti ľudskému IgG, konjugovanej s alkalickou fosfatázou (TAGO). Doštička bola inkubovaná pri teplote miestnosti počas 1 hodiny a potom premytá PBS-Tween 20. Potom bol ku každej jamke doštičky pridaný roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). V roztoku bola v každej jamke meraná jeho absorbancia pri 405 nm pomocou odpočítavacieho zariadenia pre doštičky Microplate Reader (Bio Rad), aby bola zistená koncentrácia protilátky. Pri tomto meraní bola ako štandardná látka použitý čistený Hu IgG1 λ (The Binding SITE),

(ii) Určovanie schopnosti viazať antigén

Doštička testu ELISA pre určenie schopnosti protilátky viazať antigén, bola pripravená nasledujúcim spôsobom. Každá z 96 jamiek doštičky testu ELISA (Maxisorp, NUNC) bola potiahnutá 100 μ l pot'ahovacieho pufru, obsahujúceho 1 Mg/ml ľudského PTHrP (1-34), a potom blokovaná 200 μ l riediaceho pufru. Potom bola ku každej jamke doštičky pridaná vzorka sériového riedenia supernatantu z kultúr buniek COS-7, v ktorých boli jednotlivé hybridné protilátky a zušľachtené protilátky exprimované, alebo bola k jamke doštičky pridaná vzorka sériového riedenia jednotlivých hybridných protilátok a zušľachtených protilátok vo vyčistenej

forme. Potom bola doštička inkubovaná pri teplote miestnosti a premytá PBS-Tween 20. Ku každej jamke doštičky bolo pridané 100 μ l roztoku kozej protilátky proti ľudskému IgG, konjugovanej s alkalickou fosfatázou (TAGO). Doštička bola inkubovaná pri teplote miestnosti počas 1 hodiny a potom premytá PBS-Tween 20. Potom bol ku každej jamke doštičky pridaný roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). V roztoku bola v každej jamke meraná jeho absorbanca pri 405 nm pomocou odpočítavacieho zariadenia pre doštičky Microplate Reader (Bio Rad).

(7) Potvrdenie aktivity

(i) Hodnotenie zušľachteného H reťazca

Bolo zistené, že protilátky ktoré obsahovali ako zušľachtenú verziu „a“ H reťazca tak chimérny L reťazec, vykazovali rovnakú úroveň väzobnej aktivity pre PTHrP, ako má chimérna protilátka. Tento výsledok naznačuje, že verzia „a“ dosahuje zušľachtenie v oblasti H reťazca v takom stupni, ktorý postačuje pre ďalšie hodnotenie zušľachtenia. Preto bola zušľachtená verzia „a“ H reťazca poskytnutá ako H reťazec zušľachtenej protilátky pre nasledujúce pokusy,

(ii) Aktivita hybridných protilátok

(ii-a) Hybridná protilátka FR1,2/FR3,4

Keď bol ako L reťazec použitý h/mMBC1 L(λ), nebola pozorovaná žiadna väzobná aktivita k antigénu. Naopak, keď bol ako L reťazec použitý alebo m/hMBC1La λ alebo m/hMBC1Ld λ , bola pozorovaná rovnaká úroveň väzobnej aktivity k antigénu ako u chimérnej protilátky #23-57-137-1 (Obr. 7). Tieto výsledky naznačujú, že FR3 a FR4 nespôsobujú v zušľachtených protilátkach žiadny problém, zatiaľ, čo FR1 a FR2 obsahujú aminokyselinový zvyšok (aminokyselinové zvyšky), ktoré potrebujú byť zamenené.

(ii-b) Hybridná protilátka FR1/FR2

Keď bol ako L reťazec použitý mhmMBC1L(λ), nebola pozorovaná žiadna

väzobná aktivita k antigénu. Naopak, keď bol ako L reťazec použitý hmmMBCI La(λ), bola pozorovaná rovnaká úroveň väzobnej aktivity k antigénu ako u chimérnej protilátky #23-57-137-1 (Obr. 8). Tieto výsledky naznačujú, že FR1 nespôsobuje v zušľachtenej protilátke žiaden problém, zatiaľ, čo FR2 obsahuje aminokyselinový zvyšok (aminokyselinové zvyšky), ktoré potrebujú byť zamenené,

(iii) Aktivita zušľachtených protilátok

Bola zisťovaná väzobná aktivita k antigénu u zušľachtených protilátok, ktoré ako L reťazec obsahujú jeho verzie „a“ až „f“. Výsledkom bolo zistenie, že zušľachtené protilátky, ktoré ako L reťazec obsahujú jeho verzie „j“, „l“, „m“, „o“, „q“, „r“, „s“ a „f“ vykazovali rovnakú väzobnú aktivitu k PTHrP, ako vykazovala chimérna protilátka.

(8) Získanie bunkovej línie CHO schopnej stabilnej produkcie protilátky

Aby bola získaná bunková línia schopná produkovať zušľachtené protilátky stabilne, každý z vyššie pripravených expresných plazmidov bol vnesený do buniek CHO (DXB11).

Teda, získanie bunkovej línie schopnej produkovať zušľachtené protilátky stabilne, bolo vykonané za použitia každej z nasledujúcich kombinácií plazmidov ako expresných vektorov pre bunky CHO: hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lm λ /pCOS1; hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1 Lq λ /pCOS1; a hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBCUr λ /pCOS1.

Bunky CHO boli súčasne transfekované plazmidmi elektroporovaním pomocou zariadenia Gene Pulser (Bio Rad). Potom boli expresné plazmidy oddelene štepené reštrikčným enzýmom PvuI, aby boli získané lineárne fragmenty DNA. Výsledné DNA fragmenty boli extrahované fenolom a chloroformom a potom zrážané etanolom. Takto pripravené fragmenty DNA boli použité pre nasledujúcu elektroporáciu. Teda, fragment plazmidovej DNA (10 μ g každého) bol pridaný k 0,8 ml suspenzie buniek CHO v PBS(-) (1×10^7 buniek/ml). Na výsledný roztok bolo pôsobené pulzmi s elektrostatickou kapacitou 1500 M a 25 μ F. Po 10 minútovom

zotavovacom čase pri teplote miestnosti boli elektroporézované bunky suspendované v médiu MEM-a (GIBCO), obsahujúcom 10% fetálneho tel'acieho séra (GIBCO) a potom kultivované v CO₂ inkubátore za použitia doštičiek s 96 jamkami (Falcon). Jeden deň po tom, čo bola kultivácia začatá, bolo médium zamenené za selekčné médium MEM-a bez ribonukleozidov alebo deoxyribo-nukleozidov, obsahujúce 10% fetálne tel'acie sérum (GIBCO) a 500 mg/ml Geneticinu (síran G418; GIBCO). Z kultivačného média boli vyberané bunky, do ktorých bol vnesený gén protilátky. Kultivačné médium je zamenené za čerstvé. Dva týždne po výmene média boli bunky pozorované pod mikroskopom. Keď bol pozorovaný uspokojivý rast buniek, bolo určované množstvo produkovaných protilátok bežným ELISA testom pre určovanie koncentrácie protilátok, ktorý bol popísaný vyššie. Z buniek boli vybrané tie, ktoré produkovali väčšie množstvo protilátok.

Potom bol rozsah kultivácie získanej bunkovej línie, schopnej stabilnej produkcie protilátok, zväčšený použitím fliaš v roleri, za použitia média MEM-a bez ribonukleozidov alebo deoxyribonukleozidov, obsahujúceho 2% fetálneho tel'acieho séra s ultranízky obsahom IgG. Tretí a štvrtý deň kultivácie bol supernatant z kultúr odobratý a filtrovaný na 0,2 µm filtri (Millipore), aby z neho boli odstránené zvyšky buniek. Čistenie zušľachtených protilátok zo supernatantu kultúr buniek CHO bolo vykonané pomocou stĺpca POROS s proteínom A (PerSeptive Biosystems) na zariadení ConSep LC100 (Millipore), podľa návodu pribaleného k súprave. Zušľachtené protilátky boli použité ako vzorky pre určovanie neutralizačnej aktivity a pre testovanie farmakologickej účinnosti na zvieracích modeloch hyperkalcinémie. Koncentrácia a väzobná aktivita k antigénu bola u čistených zušľachtených protilátok určovaná pomocou rovnakého ELISA systému, ktorý bol popísaný vyššie.

Referenčný príklad 5: Zisťovanie neutralizačnej aktivity

Zisťovanie neutralizačnej aktivity myších protilátok, chimérnych protilátok a zušľachtených protilátok bolo vykonané pomocou bunkovej línie krysích myelomových bunkách ROS18/2.8-5. Bunky ROS18/2.8-5 boli kultivované v médiu Ham'S F-12 (GIBCO) obsahujúcom 10% fetálneho tel'acieho séra (GIBCO) v CO₂ inkubátore. Bunky ROS18/2.8-5 boli vysiate do každej jamky doštičky s 96 jamkami v hustote 10⁴ buniek/100 µl/jamku a kultivované počas 1 dňa. Potom čo bola kultivácia

ukončená, bolo kultivačné médium zamenené za médium HamS F-12, obsahujúce 4 mM hydrokortizónu a 10% fetálneho tel'acieho séra. Po kultivácii tri až štyri dni boli kultivované bunky premyté 260 μ l média HamS F-12 (GIBCO), a potom bolo pridané 80 μ l média HamS F-12, obsahujúceho 1 mM isobutyl-1 -metyl xantín (IBMX, SIGMA), 10% fetálneho tel'acieho séra a 10 mM HEPES. Výsledná zmes bola inkubovaná pri teplote 37 °C počas 30 minút.

Média z bunkových kultúr, ktoré obsahujú myšiu protilátku, chimérnu protilátku a zušľachtené protilátky, v ktorých má byť testovaná neutralizačná aktivita, bola najskôr sériovo nariedená v nasledujúcich riediacich sériách: [10 μ g/ml, 3,3 μ g/ml, 1,1 μ g/ml a 0,37 μ g/ml], [10 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,5 μ g/ml a 0,01 μ g/ml] a [10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1,25 μ g/ml, 0,63 μ g/ml a 0,31 μ g/ml]. Každá vzorka roztoku nariedených protilátok bola miešaná s ekvivalentným množstvom 4 mg/ml PTHrP (1-34). Výsledný zmiešaný roztok (80 μ l) bol pridaný do každej jamky. V každej jamke sa konečná koncentrácia každej protilátky stala štvrtinová vzhľadom k vyššie spomenutej koncentrácii protilátky a v súhlase s tým sa koncentrácia PTHrP (1-34) stala 1 mg/ml. Po pôsobení pri teplote miestnosti počas 10 minút bol supernatant bunkovej kultúry odobratý a zvyšok bol 3x premytý PBS. Potom bol z buniek extrahovaný cAMP pomocou 100 μ l zmesi 0,3% HCl-95% etanol a potom bola zmes HCl-etanol odparená pomocou vodnej vývevy. Zvyšok bol rozpustený v 120 μ l pufru EIA, ktorý je súčasťou súpravy cAMP EIA Kit (CAYMAN CHEMICAL'S), aby z neho bol cAMP extrahovaný. Množstvo cAMP bolo určené pomocou súpravy cAMP EIA Kit (CAYMAN CHEMICAL'S), podľa návodu priloženého k súprave. Výsledkom bolo zistenie, že medzi zušľachtenými protilátkami, ktoré majú rovnakú úroveň väzobnej aktivity k antigénu ako chimérna protilátka, tie ktoré obsahujú L reťazec verzií „q“, „r“, „s“ a „t“ (v ktorých bola aminokyselina tyrozín 91. na pozícii zamenená za izoleucín), vykazovali podobnú neutralizačnú aktivitu ako chimérna protilátka, a že protilátka obsahujúca L reťazec verzie „q“ vykazovala najsilnejšiu neutralizačnú aktivitu.

Zoznam sekvencií - otvorený text

SEQ ID NO: 1	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 2	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 3	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 4	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 5	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 6	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 7	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 8	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 9	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 10	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 11	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 12	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 13	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 14	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 15	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 16	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 17	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 18	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 19	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 20	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 21	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 22	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 23	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 24	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 25	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 26	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 27	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 28	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 29	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 30	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 31	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 32	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 33	Syntetizovaná DNA

SEQ ID NO: 34	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 35	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 36	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 37	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 38	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 39	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 40	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 41	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 42	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 43	Syntetizovaná DNA
SEQ ID NO: 44	Syntetizovaná DNA

Priemyselná využiteľnosť

Predložený vynález poskytuje terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu odolnú proti liekom, ktoré obsahujú ako svoju aktívnu zložku látku schopnú inhibovať väzbu medzi PTHrP a jeho receptorom.

Na základe skutočnosti, že po podaní látky bolo pozorované zlepšenie hladiny vápnika v krvi a telesnej hmotnosti na zvieracom modeli hyperkalcinémie odolnej k liekom, bolo zistené, že látka je užitočná ako terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu odolnú proti liekom.

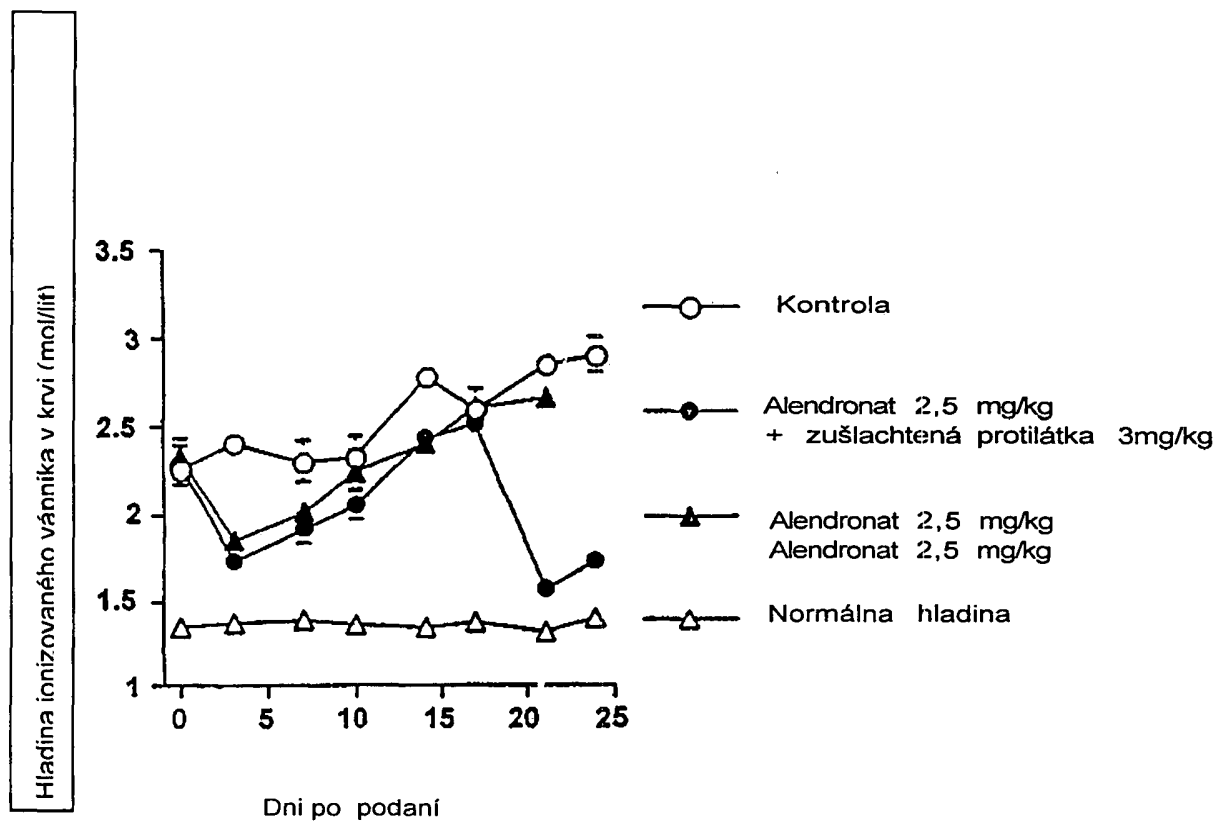
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu odolnú proti liekom, **vyznačujúce sa tým, že** obsahuje ako svoju aktívnu zložku látku schopnú inhibovať väzbu medzi proteínom podobným hormónu prištítnych teliesok (PTHrP) a jeho receptorom.
2. Terapeutické činidlo podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým, že** hyperkalcinémiu odolná proti liekom je odolná proti terapeutickému činidlu pre hyperkalcinémiu, inému ako je látka schopná inhibovať väzbu medzi PTHrP a jeho receptorom.
3. Terapeutické činidlo podľa nárokov 1 alebo 2, **vyznačujúce sa tým, že** terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu je činidlo inhibujúce vstrebávanie kostnej drene, činidlo zvyšujúce vylučovanie vápnika, činidlo inhibujúce črevné vstrebávanie vápnika alebo močopudné činidlo.
4. Terapeutické činidlo podľa nárokov 1 alebo 2, **vyznačujúce sa tým, že** terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu je činidlo inhibujúce vstrebávanie kostnej drene.
5. Terapeutické činidlo podľa nároku 4, **vyznačujúce sa tým, že** činidlo inhibujúce vstrebávanie kostnej drene je bifosfonát alebo kalcitonín.
6. Terapeutické činidlo podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, **vyznačujúce sa tým, že** látkou je agonista PTHrP receptora.
7. Terapeutické činidlo podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, **vyznačujúce sa tým, že** látkou je protilátka proti PTHrP.
8. Terapeutické činidlo podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, **vyznačujúce sa tým, že** látkou je fragment protilátky proti PTHrP a/alebo modifikovaná forma fragmentu.
9. Terapeutické činidlo podľa nároku 7, **vyznačujúce sa tým, že** protilátka je

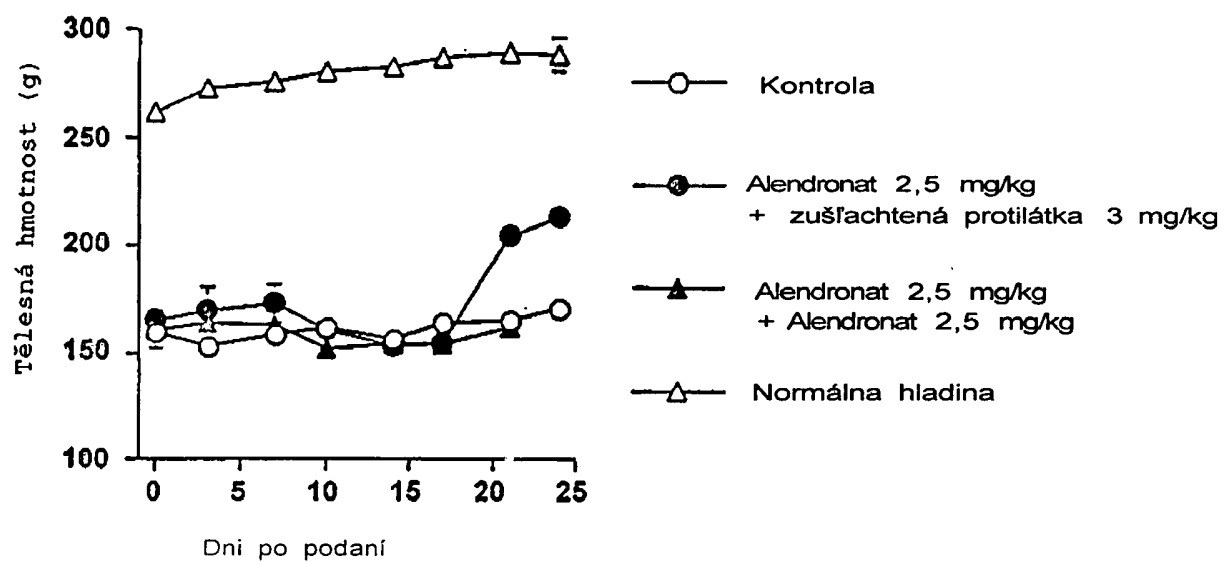
monoklonálna.

10. Terapeutické činidlo podľa nároku 7, **vyznačujúce sa tým, že** protilátka je ľudská protilátka alebo zušľachtená alebo chimérna protilátka.
11. Terapeutické činidlo podľa nároku 7, **vyznačujúce sa tým, že** protilátka je v zušľachtenej forme.
12. Terapeutické činidlo podľa nároku 11, **vyznačujúce sa tým, že** zušľachtená protilátka je zušľachtená protilátka #23-57-137-1.
13. Terapeutické činidlo podľa ktoréhokolvek z nárokov 1 až 12, **vyznačujúce sa tým, že** hyperkalcinémia odolná k liekom je spôsobená rakovinou.

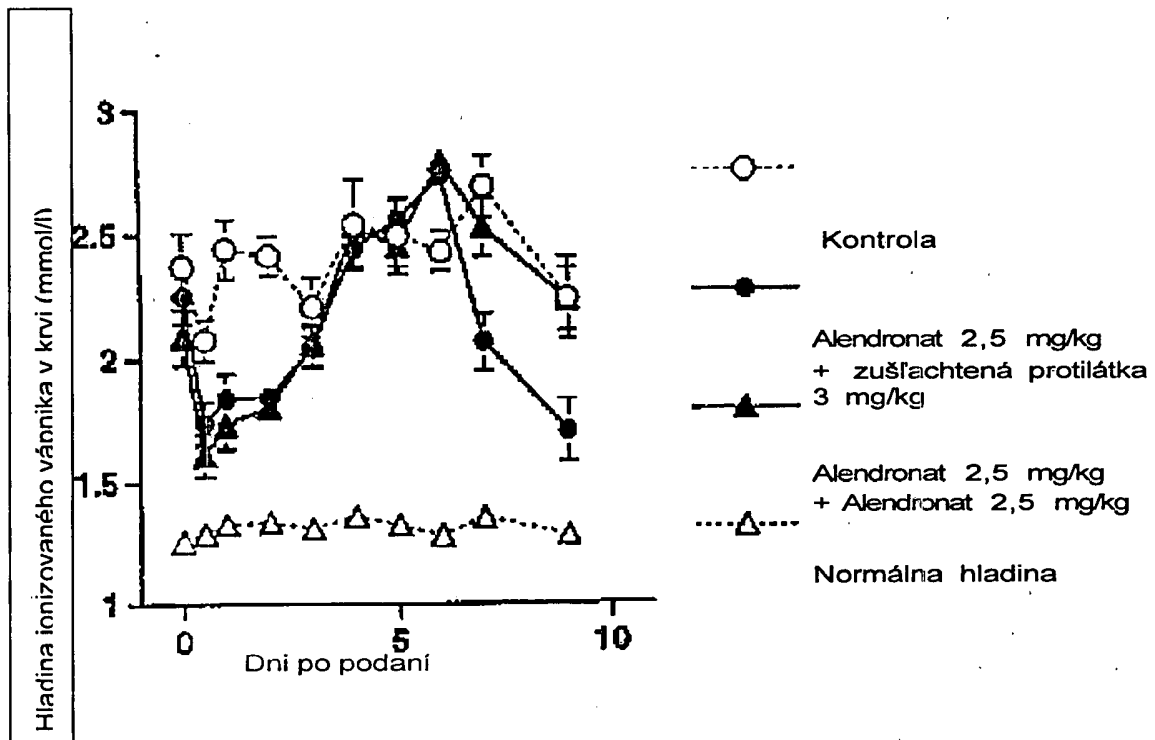
Obrázok 1



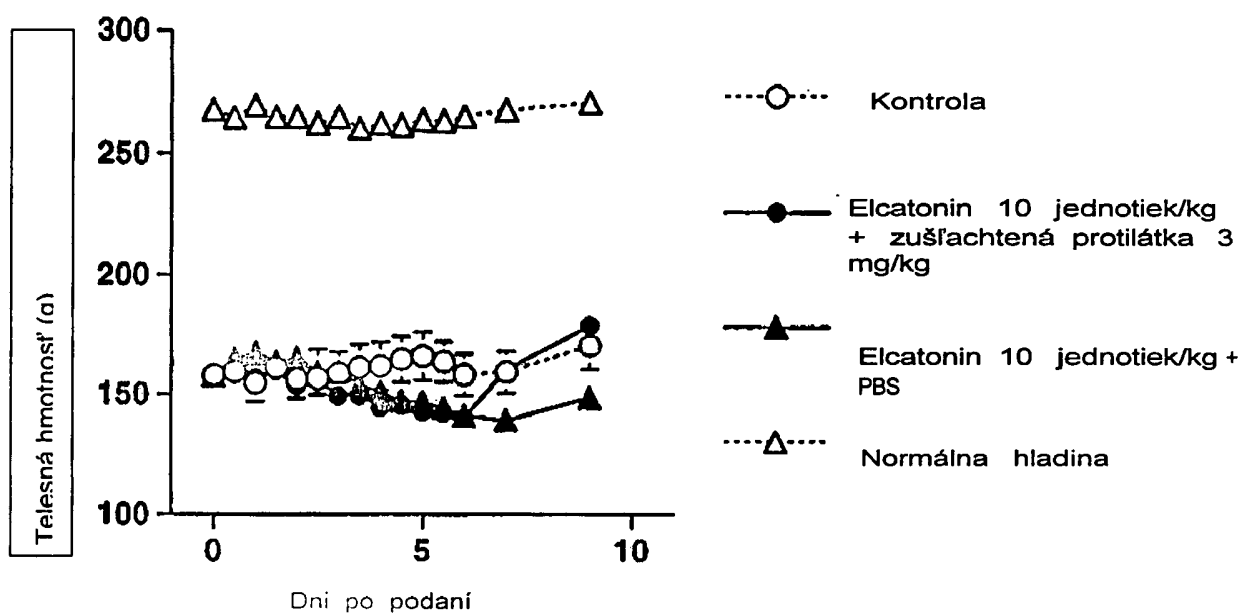
Obrázok 2



Obrázok 3



Obrázok 4



ZÓZNAM SEKVENCIÍ

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Terapeutické činidlo pre hyperkalcinémiu

<130> PH-946-PCT

<150> JP 11-192270

<151> 1999-07-06

<160> 75

<170> PatentIn Věr. 2.0

<210> I

<211> 20

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> I

aaatagccct tgaccaggca

20

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 2

ctgggtcggc ccacctctga aggtccaga atcgatag

38

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 4

ggatcccggg tcagrggaag gtggraaca

29

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 5

gttttcccag tcacgac

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 7

gtctaagctt ccacatgaa acttcgggct c

31

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 8

tgttggatcc ctgcagagac agtgaccaga

30

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 9

gtctgaattc aagcttcac catgggggtt gggctg

36

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 10

ttcccgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgacca g

41

<210> 11

<211> 109

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia - .•

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 11

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa cccacggtc accctgtcc 60

cgccctctc tgaggagctc caagccaaca aggccacact agtgtgtct

109

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia .

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 12

ggtttggtgg tctccactcc cgccttgacg gggctgcat ctgcctcca ggccactgtc 60
acagctcccg ggtagaagtc actgatcaga cacactagtg tggccttgtt 110

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 13

ggagtggaga ccaccaaacc ctcaaacag agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 60
ctgagcctga cgcccagca gtggaagtcc cacagaag 98

<210> 14

<211> 106

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 14

tgttgaattc ttactatgaa cattctgtag gggccactgt cttctccacg gtgctccctt 60
catgcgtgac ctggcagctg tagcttctgt gggacttcca ctgctc 106

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 15

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa ccc

43

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 16

tgttgaattc ttactatgaa

20

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 17

caacaagtac gcggccagca gctacctgag cctgacgcc

39

<210> 18 <211> 39' <212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 18

gtagctgctg gccgcgtact tgttggtgct ctgtttgga

39

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 19

gtctgaattc aagcttagtc ctaggtcgaa ctgtggctgc accatc

46

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 20

tgttgaattc ttactaacac tctcccctgt tgaa

34

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 21

gtctaagcct ccaccatggc ctggactcct ctctt

35

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 22

tgttgaattc agatctaact acttacctag gacagtgacc ttggctcc

48

<210> 23

<211> 128 <212> DNA <213>

Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 23

gtctaagctt ccaccatggg gtttgggctg agctggggtt tcctcgttc tctttaaga 60

gggtgccagt gtcaggtgca gctggggag tctgggggag gcggtgtcca gcctgggagg 120

tcctgag 128

<210> 24

<211> 125

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 24

accattagta gtgggtgtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaagg gcgattcacc 60

atctccagag acaattcaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 120

gacac 125

<210> 25

<211> 132

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 25

ctaccaccac tactaatggt tgccaccac tccagcccct tgctggagc ctggcggacc 60

caagacatgc catagctact gaaggtgaat ccagaggctg cacaggagag tctcagggac 120

ctcccaggct gg

132

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 26

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc cccagtaagc aaagtaagtc 60

atagtagtct gtctcgaca gtaatacaca gccgtgtcct cagctctcag

110

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 27

gtctaagcgt ccaccatggg gtttgggctg

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 28

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg

30

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 29

acaaagcttc caccatggcc tggactcctc tcttctctt ctttgttctt cattgctcag 60

gttctttctc ccagcttgtg ctgactcaat cgccctctgc ctctgcctcc ctgggagcct 120

oggtcaagct cac

133

<210> 30

<211> 118

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 30

agcaagatgg aagccacagc acaggtgatg ggattcctga tcgcttctca ggctccagct 60
ctggggctga gcgctacctc accatctcca gcctccagtc tgaggatgag gctgacta 118

<210> 31

<211> 128

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 31

ctgtggcttc catcttgctt aagtttcac aagtaccgag ggcccttctc tggctgctgc 60
tgatgccatt caatgggtga cgtačgtgc tgactactca aggtgcaggt gagcttgacc 120
gaggctcc 128

<210> 32

<211> 114

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia ..

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 32

cttggatccg ggctgaccta ggacgggcag ttgggtccct ccgccgaaca ccctcacaaa 60
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gtaatagtca gcctcatcct caga 114

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 33 acaaagcttc

caccatg 17

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 34 cttggatccg

ggctgacct 19

<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 35

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag ttgggtccct cggccgaaca cgtacacaaa 60

ttgttcctta attgt

75

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 36

aaaggatcct taagatccat caagtaccga ggggggtctct ctg

43

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 37

acaaagctta gcgctacctc accatctcca gcctccagcc tgagga

46

<210> 38

<211> 111

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 38

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag ttggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60

ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gatatagtca gcctcatcct c

111

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 39

cttctctggc tgctgctgat accattcaat ggtgtacgta ct

42

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 40

cgagggccct tctctggctg ctgctg

26

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 41

gagaagggcc ctargtacst gatgrawcctt aagca

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 42

cacgaattca ctatcgattc tggaaccttc agagg

35

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 43

ggcttggagc tcctcaga

18

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 44

gacagtgggtt caaagtttt

20

<210> 45 <211> 118

<212> PRT <213> Mus

museu | us

<400> 45

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

<210> 46 <211> 118

<212> PRT <213> Mus

museulus

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
15 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gin Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gin Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gin Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 47 <211> 116
 <212> PRT <213> Horao
 sapiens

<400> 47
 Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro-Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 15 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp His Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Lys Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly
 115

<210> 48 <211> 118

<212> PRT <213> Homo

sapiens

<400> 48

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

<210> 49 <211> 118

<212> PRT <213> Homo

sapiens

<400> 49

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 50 <211> 118

<212> PRT <213> Homo

sapiens

<400> 50

Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

15

10

15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser Thr Tyr Thr

20

25

30

Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met

35

40

45

Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85

90

95

Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

105

110

Thr Val Leu Gly Gin Pro

115

<210> 51 <211> 118

<212> PRT <213> Homo

sapiens

<400> 51

Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

15

10

15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser Thr Tyr Thr

20

25

30

Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met

35 40 45
 Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gin Pro
 115

<210> 52

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

	85	90	95
Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
100	105	110	
Thr Val Leu Gly Gin Pro			
115			
<210> 53 <211> 118			
<212> PRT <213> Homo sapiens			
<400> 53			
Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala			
I	5	10	15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser Thr Tyr Thr			
20	25	30	
Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met			
35	40	45	
Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp			
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp			
85	90	95	
Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
100	105	110	
Thr Val Leu Gly Gin Pro			
115			

<210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

15 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 55 <211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

15

10

15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20

25

30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met

35

40

45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85

90

95

Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

105

110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 56 <211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 57 <211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222>(1)..(411)

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 57

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

-15

-10

-5

gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tet ggg gga gac tta gtg aag 96

Val Gin Cys Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 - 1 1 5 10
 cct gga ggg tec ctg aaa ctc tec tgt gca gcc tet gga ttc act ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 agt agc tát ggc atg tet tgg att cgc cag act cca gac aag agg ctg 192
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gin Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 30 35 40 45
 gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt ggt agt tác acc tác tát cca 240
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 50 55 60
 gac agt gtg aag ggg ega ttc acc atc tec aga gac aat gcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 acc čta tác ctg caa atg agc agt ctg aag tet gag gac aca gcc atg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gin Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 80 85 90
 ttt tác tgt gca aga cag act act atg act tác ttt gct tác tgg ggc 384
 Phe Tyr Cys Ala Arg Gin Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly
 95 100 105
 caa ggg act ctg gtc act gtc tet gca 411
 Gin Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110 115

<210> 58

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> <221> CDS

<222> (1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 58

```
atg ggg ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt   48
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val  Ala Leu Leu Arg Gly
          -15          -10          -5

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tet ggg gga ggc gtg gtc cag   96
Val  Gin Cys Gin Val  Gin Leu Val  Clu Ser Gly Gly Gly Val  Val  Gin
      - 1 1          5          10

cct ggg agg tec ctg aga ctc tec tgt gca gcc tet gga ttc acc ttc   144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15          20          25

agt agc tát ggc atg tet tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg   192
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      30          35          40          45

gag tgg gtg gca acc att agt agt ggt ggt agt tác acc tác tát cca . 240
Glu Trp Val  Ala Thr  Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
          50          55          60

gac agt gtg aag ggg ega ttc acc atc tec aga gac aat  tec aag aac   288
Asp Ser Val  Lys Gly Arg Phe Thr  Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
      65          70          75

acg ctg tát  ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg   336
Thr Leu Tyr Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala  Glu Asp Thr Ala Val
```

80	85	90	
tát	tác	tgt	gcg aga cag act act atg act tác ttt gct tác tgg ggc 384
Tyr	Tyr	Cys	Ala Arg Gin Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly
95	100	105	
cag	gga	acc	ctg gtc acc gtc tec tca • 411
Gin	Gly	Thr	Leu Val Thr Val Ser Ser
110	115		

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys	Ala	Ser	Gin	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	Val	Ala
1					5					10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr
1					5	

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

I 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Pro Tyr Trp Met Gln

15

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

I 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220> <221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 65

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec caa ctt gtg ctc act cag tca tet tca gcc tet ttc tec 96

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tca gca aaa ctc acg tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tát cag caa cag cca ctc aag cct cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Leu Lys Pro Pro Lys

30	35	40	45	
tát gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg	240			
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly				
50	55	60		
att cct gat cgc ttc tet gga tec agc tet ggt gct gat cgc tác ctt	288			
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu				
65	70	75		
agc att tec aac atc cag cca gaa gat gaa gca atg tác atc tgt ggt	336			
Ser Ile Ser Asn Ile Gin Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly				
80	85	90	•	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tát gtt ttc ggc ggt ggg	384			
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly				
95	100	105		
acc aag gtc act gtc čta ggt cag ccc	411			
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gin Pro				
110	115			

<210> 66 <211> 411

<212> DNA <213>

Homo sapiens

<220> <221> CDS

<222> (1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 66

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp .Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tet gcc tet gcc tec 96

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg cat cag cag cag cca gag aag ggc cct cgg 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg

30 35 40 45

tac ttg atg aaa ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50 55 60

att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tac ctc 288

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

65 70 75

acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336

Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly

80 85 90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384

Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

95 100 105

acc aaa ctg acc gtc cta ggt cag ccc

411

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro

110 115

<210> 67 <211> 411

<212> DNA <213>

Homo sapiens

<220> <221>

CDS <222> (1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 67

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tet gcc tet gcc tec 96

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag. ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tát cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Lys

30 35 40 45

tác ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc čta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro
 110 115

<210> 68

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> <221>

CDS <222>

(1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 68

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
-15 -10 -5
tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tet gcc tet gcc tec 96
Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
- 1 1 5 . 1 0
ctg gga gcc tcg gtc aag ctě acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser
15 20 25
acg tac acc att gaa tgg tát cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Lys
30 35 40 45
tác gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
50 55 . 6 0
att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tác ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
65 70 75
acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tát tác tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
80 85 90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttg gtg tác gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
acc aaa ctg acc gtc čta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro
110 115

<210> 69

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> <221>

CDS <222> (1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 69

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tet gcc tet gec tec 96

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tát cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg

30 35 40 45

tác ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50 55 60

att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tác ctc 288

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

65	70	75	
acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tát tác tgt ggt 336			
Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly			
80	85	90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tác gtg ttc ggc gga ggg 384			
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly			
95	100	105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411			
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro			
110	115		

<210> 70

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 70

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48			
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly			
-15	-10	-5	
tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tet gcc tet gcc tec 96			

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 - 1 1 5 10
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro
 110 115

<210> 71

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS <222>

(1). (411)

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 71

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tet gcc tet gcc tec 96

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tát cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Lys

30 35 40 45

tác ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50 55 60

att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tác ctc 288

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

65 70 75

acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tát atc tgt ggt 336

Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly

80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro

110 115

<210> 72

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 72

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tet gcc tet gcc tec 96 Ser Phe

Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro
 110 115

<210> 73

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zrelý peptid

<222> (58).. (411)

<400> 73

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tet ttc tec cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tet gcc tet gcc tec 96

Ser Phe Ser Gin Leu Val Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

- 1 1 5 10

ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gin His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tát cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Lys

30 35 40 45

tác gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50 55 60

att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tác ctc 288

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

65 70 75

acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tát atc tgt ggt 336

Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly

80 85 90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tác gtg ttc ggc gga ggg 384

Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gin Gin Gin Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tác gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gin Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tec agc tet ggg gct gag cgc tác ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tec agc ctc cag tet gag gat gag gct gac tát atc tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gin Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tác gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gin Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gin Pro
 110 115

<210> 75

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Val Ser Glu His Gin Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gin
 15 10 15
 Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25 30
 Thr Ala