

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

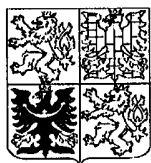
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 1724-97

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25. 11. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.12.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/350915**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 10. 97**  
**(Věstník č. 10/97)**

(86) PCT číslo: **PCT/EP95/04648**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/17874**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 07 K 16/28**  
**A 61 K 39/395**  
**C 12 P 21/08**

(71) Přihlášovatel:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Nagy Zoltan, Verona, NJ, US;

Vidovic Damir, Fairfield, NJ, US;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,  
10100;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Fragmenty monoklonální protilátky, mající imunosupresorovou aktivitu**

(57) Anotace:

Monovalentní mAb fragmenty (Fab) mAb, které mají schopnost snižovat HLA-DR expresi na antigen prezentujících buňkách. Fab fragmenty mohou snižovat takovou HLA-DR expresi bez cytotoxicity původních mAb nebo bivalentních fragmentů (F(ab)<sub>2</sub> mAb. Fab fragmenty podle vynálezu jsou proto silné, pro třídu II MHC specifické imunosupresivní sloučeniny bez cytotoxických vedlejších účinků.

CZ 1724-97 A3

rovan

Fragmenty monoklonální protilátky, mající imunosupresorickou aktivitu.

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká fragmentů monoklonální protilátky, majících imunosupresorickou aktivitu.

### Dosavadní stav techniky

Třída II molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) váže antigenní peptidové fragmenty a prezentuje je pomocným (CD4+) T buňkám ("Th" buňkám) (1). U monoklonálních protilátek (MAb) specifických pro třídu II MHC molekul se ukázalo, že jsou extrémně silnými selektivními inhibitory odpovědi Th buněk in vitro (2). Vzhledem k tomuto zjištění byly tyto považovány za potenciální léčiva pro selektivní imunosupresivní terapii autoimunitních chorob, jako je revmatoidní artritida. Počáteční in vivo studie ukázaly prospěšný vliv těchto mAb na Th buňkami zprostředkované hetero a autoimunitní odpovědi (3 - 6). Nicméně, v některých případech byla experimentální in vivo aplikace specifických mAb proti třídě II MHC asociována s neočekávanými komplikacemi spojenými s úmrtím laboratorních primátů (7, 8). Pozdější pozorování snížila zájem o další studie imunomodulace MHC specifickými mAb. Nedávná publikace popsala, že 10ti násobná redukce exprese třídy II MHC u transgenních myší způsobuje neodpovídavost Th buněk díky neúčinné antigenní prezentaci (19). Toto ukazuje, že redukce exprese třídy II MHC koreluje s imunosupresí v in vivo modelu.

PRŮM.

VLASTNICTVÍ

PRŮMYSLOVÉHO

URÁD

23 VII 97

DOŠLO

054878

č.j.

### Podstata vynálezu

Podle vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že monovalentní mAb fragmenty (Fab) mAb, které mají schopnost snižovat expresi HLA-DR, mohou samy o sobě snižovat takovou expresi HLA-DR bez cytotoxicity mAb buď samostatně, nebo jako bivalentní fragmenty (F)ab'2) mAb. Fab fragmenty podle vynálezu jsou proto silnými pro třídu II MHC specifickými imunosupresivními sloučeninami bez cytotoxických vedlejších účinků. Protože je dále vynález popsán podrobněji, je dále podán stručný popis obrázků.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1: Účinky DR vázajícího se kompetitorního peptidu a DR specifické mAb na EBV transformovanou B buněčnou linii Priess.

Obrázek 2: Časový průběh modulačních a cytotoxických účinků mAb L243 na LG2 .

Obrázek 3: Trvání modulačních a cytotoxických účinků L243 na LG2 po odstranění mAb.

Obrázek 4: Snížení HLA-DR exprese v různých APC populacích po kokultivaci s DR specifickou mAb L243 a jejími fragmenty.

Obrázek 5: Účinky zvýšené koncentrace DR specifického Fab fragmentu na EBV transformovanou B buněčnou linii LG2.

Obrázek 6: Účinky prolongované kokultivace L243 a jejích fragmentů na LG2 buňky.

Obrázek 7: Závislost EBV-LCL cytotoxicity na DR-zkříženou vazbu.

Obrázek 8: Selektivita DR "downregulation" na klidové B buňky a monocyty/makrofágy.

Obrázek 9: Selektivita DR "downregulation" na B buněčné blasty.

Obrázek 10: Selektivita DR "downregulation" na LG2 buňky.

Obrázek 11: Alotypová ne-selektivita DR "downregulation" způsobené mAb.

Obrázek 12: "Downregulation" celé třídy II na TS-10 buňkách způsobená 1-1C4 Fab.

Obrázek 13: Nedostatek sekrece TNF $\alpha$  zvýšený při kokultivaci LG2 a Priess buněk s L243 a jejími fragmenty.

Obrázek 14: Požadovaná koncentrace protilátek pro inhibici Th buněk a DR "downregulation".

Obrázek 15: Účinek anti-DR mAb a Fab fragmentů na presentaci antigenu fixovanými APC.

Obrázek 16: Účinek antigenu zavedeného na silné mAb, Fab a peptidové antagonisty.

Obrázek 17: Relativní účinky Fab a peptidu na křivky odpovědi v závislosti na dávce antigenu.

Obrázek 18: Účinek třídy II antagonistů na nástup odpovědi Th buněk.

Jisté monoklonální protilátky (mAb), které jsou specifické pro HLA-DR (lidský leukocytární antigen typu "DR"; třída II hlavního histokompatibilního komplexu ("MHC") molekul) mohou snižovat expresi HLA-DR molekul na povrchu leukocytů, které jsou antigen prezentujícími buňkami ("APC") o asi 90%. Stejně mAb také inhibují aktivaci klonů lidských Th buněk, které vyžadují presentaci antigenu HLA-DR

molekulami pro aktivaci. Inhibiční potenciál takových mAb je několikasetkrát až nekolikatisíckrát vyšší než potenciál nyní dostupných peptidových antegonistů (viz. tabulka 1, níže). Toto snížení exprese HLA-DR a inhibice aktivace Th buněk je farmakologickou aktivitou, jejímž výsledkem je imunosuprese. Tato imunosuprese může být využitelná v léčbě autoimunitních chorob, zejména revmatoidní artritidy.

Podle vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že monovalentní, antigen vázající mAb fragmenty (Fab) mAb, mající schopnost snižovat expresi HLA-DR mohou sami snižovat takovou HLA-DR expresi bez cytotoxicity mAb, buď samy, nebo jako bivalentní fragmenty (F(ab)'<sub>2</sub>) mAb. Fab fragmenty podle vynálezu jsou proto silné, pro třídu II MHC specifické imunosupresivní sloučeniny bez cytotoxických vedlejších účinků. Tak předkládaný vynález obsahuje Fab fragment anti-HLA-DR mAb, kde uvedená intaktní mAb je cytotoxická pro antigen prezentující buňky a snižuje HLA-DR expresi na zbývajících antigen prezentujících buňkách. Taková mAb inhibuje aktivaci Th buněk. mAb, ze kterých jsou Fab fragmenty podle předkládaného vynálezu odvozeny, se všechny vážou na první doménu HLA-DR.

Příklady tří "downregulujících" mAb použitelných podle vynálezu jsou:

LB3.1 (myší IgG<sub>2b</sub>, pan-DR $\alpha$ 1-specifická; odkazy 9-10);

L243 (myší IgG<sub>2a</sub>, pan-DR $\alpha$ 1-specifická; odkazy 10-11; ATCC přírůstkové číslo HB55); a

SFR3-DR5 (kryší IgG<sub>2b</sub>. DRB1\*110X-specifická; odk. 13;

ATCC přírůstkové číslo HB-151).

Kromě toho, HLA-DR "downregulující" mAb, 1-1C4 (myší IgG<sub>2a</sub>, β-řetězec specifická; odk. 14), která navíc "downreguluje" HLA-DQ a -DP, byla generována konvenčními prostředky jak je popsáno v příkladu 22. Tak jsou Fab fragmenty výše uvedené mAb zahrnuty v předkládaném vynálezu.

V souladu se schopností "downregulujících" mAb inhibovat aktivaci Th buněk, pět "non-downregulujících" mAb, CCCL20 (myší IgG<sub>2b</sub>, specifická pro tři DRB1 (β-řetězec) alelické formy (DRB1\*0101, DRB1\*0401, DRB1\*0404; odk. 12) a 8D1, 9F1, 9F2, 10F12 (všechny čtyři myší IgG1), inhibují aktivitu Th buněk pouze velmi slabě nebo vůbec.

Aktivní mAb jsou cytotoxické pro B lymfoblastoidní buňky a pro malou část normálně aktivovaných B buněk. Stejně jako mAb, bivalentní (F(ab)'<sub>2</sub>) fragmenty těchto mAb zprostředkují "downregulaci", ale jsou také cytotoxické. Nicméně, podle vynálezu, monovalentní Fab fragmenty těchto mAb ztratily cytotoxicitu, ale překvapivě si zachovaly "downregulující" vlastnosti původní mAb.

Anti-HLA-DR mAb použité pro získání Fab fragmentů podle vynálezu mohou být produkovány jakýmikoliv konvenčními prostředky, např. obecně postupy prvně popsány Kohlerem a Milsteinem. Injekcí antigenu do myši nebo krysy, králíka, ovce a podobně (preferovaně myši) mohou být připraveny monoklonální protilátky odebráním protilátky produkujících buněk z takového imunizovaného zvířete a imortalizací uvedených buněk konvenčním způsobem fúzí s myelomovými

buňkami, např. PAI myšími myelomovými buňkami, SP2/0- nebo SP2/0-Ag14-buňkami (ATCC č. CRL 1581; ATCC č. CRL 8287) (pro obecný návod pro produkci protilátek viz. např. "Antibodies - A Laboratory Manual", Harlow and Lee, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). Supernatanty kultur takových hybridomů potom mohou být vyšetřovány na monoklonální protilátky (mAb) běžnými postupy jako je radioimuno- nebo enzymimuno- nebo tečková imunovazba nebo imunofluorescenčními testy. mAb mohou být purifikovány ze supernatantu hybridomů běžnými chromatografickými postupy jako je například iontová výměnná chromatografie, afinitní chromatografie na proteinu A, anti-imunoglobulinovými protilátkami nebo navázáním antigenu nebo jeho části na pevný nosič, HPCL a podobně. Produkce mAb použitelných podle vynálezu je ukázána v příkladu 22.

Pro produkci velkých množství mAb, podle metod dobře v oboru známých, mohou být hybridomy secernující požadovanou protilátku injikovány intraperitoneálně myším, které byly předem ošetřeny, například, pristanem před injikováním. Více než 100 mg mAb může být produkováno výsledným nádorovým ascitem u jedné myši. mAb mohou být purifikovány z ascitu produkovánému takovými nádory metodami popsány výše.

mAb mohou být charakterizovány na jejich podtřídy známými metodami, jako je Ouchterlony imunodifuse. V oboru je také známé, že mAb mohou být modifikovány pro různé použití, nebo mohou být generovány jejich fragmenty, které jsou stále ještě schopné vazby antigenu. Takové fragmenty mohou být generovány například, enzymovým trávením mAb papainem, pepsinem a podobně.

Imunogenem pro produkci mAb, který může být použit podle vynálezu je preferovaně HLA-DR  $\beta$ -řetězec (viz. například WO92/10589; J. Biol. Chemistry 262: 8748 - 8758 (1987)); informace o sekvenci může být také získána z databáze sekvencí, například jako je Genbank (Intelligenetics, California, USA), European Bioinformatics Institute (Hinxton Hall, Cambridge, GB), NBRF (Georgetown University, Medical Centre, Washington DC, USA) a Vecbase (University of Wisconsin, Biotechnology Centre, Medison, Wisconsin, USA); takové sekvence mohou být použity podle metod v oboru známých k produkci antigenu pro přípravu monoklonálních protilátek pro použití v předkládaném vynálezu), který byl purifikován běžnými prostředky, jako je SDS-PAGE.

Identifikace výše popsaných anti-HLA-DR mAb, které jsou cytotoxické pro APC a také snižují HLA-DR expresi může být provedena jakýmikoliv běžnými prostředky. Preferovaně je tato identifikace provedena v souladu s příkladem 3, kde je použito virem Epstein-Barrové transformované lidské B-lymfoblastické buněčné linie (EBV-LCL) jako modelu APC (zejména aktivovaných B buněk). Kultury alespoň 1 ml obsahující okolo  $10^5$  EBV-LCL buněk na ml jsou preferovaně použity. Kultura je inkubována s 20 nM anti-HLA-DR mAb po 16 hodin, a počet mrtvých buněk a HLA-DR exprese u zbývajících přeživších buněk je určen běžnými prostředky. Pro účely tohoto vynálezu jsou cytotoxicita a snížení exprese definovány takto: 1) mAb je cytotoxická pro antigen prezentující buňku, jestliže, za výše uvedených podmínek, je usmrceno alespoň 25 %, lépe 40 % EBV-LCL antigen prezentujících buněk intaktní mAb; a 2) mAb snižuje HLA-DR

expresi na antigen prezentujících buňkách jestliže, za výše uvedených podmínek, redukuje množství HLA-DR molekul na povrchu EBV-LCL antigen prezentujících buněk, které zůstávají naživu, alespoň v průměru o 50 %.

EBV-LCL antigen prezentující buňky jsou označeny pro detekování mrtvých buněk a pro měření HLA-DR exprese přežívajících buněk běžnou imunofluorescencí. Buňky jsou analyzovány za použití průtokového cytometru (např. FACScan, Becton - Dickinson, San Jose, California) a procento mrtvých buněk a redukce HLA-DR exprese na zbývajících buňkách je počítána běžnými prostředky, preferovaně za použití softwaru normálně používaného ve spojení s průtokovým cytometrem (např. LYSIS II software s FACScan cytometrem).

EBV-LCL použité pro vyšetřování na monoklonální protilátky nejsou zásadní. Jakékoliv běžné EBV-LCL mohou být použity podle vynálezu. Příklady EBV-LCL použitelných podle vynálezu jsou Priess (ECACC (Salisbury, UK) přírůstkové č. 86052111), LG2 (Istituto Nazionale Per La Ricerca Sul Cancro (Genova, Italy) přírůstkové č. G201 12301), a TS-10 (ECACC (Salisbury, UK) přírůstkové č. 85102911).

Fab fragmenty výše popsaných mAb mohou být produkovány jakýmikoliv běžnými prostředky. Fab fragmenty mohou být produklovány trávením původní mAb pepsinem a izolováním Fab fragmentů prostředky v oboru známými (např. Andrew and Titus, "Fragmentation of immunoglobulin G", Current Protocols in Immunology, Coligan et al., eds. (Greene and Wiley 1994)). V souladu s tím jsou tyto procesy a Fab fragmenty připravené takovými procesy také předmětem

předkládaného vynálezu. Preferovaně jsou Fab fragmenty podle vynálezu produkovány rekombinantní buněčnou linií, která exprivuje gen, který koduje požadovaný Fab fragment. Takové rekombinantní buněčné linie mohou být produkovány jakýmikoliv běžnými prostředky. Například, část genu kodující Fab fragment může být klonována běžnými prostředky z hybridomu, který secernuje původní mAb Fab fragmentu. cDNA Fab fragmentu může potom být inkorporována běžnými prostředky do expresního vektoru, který je potom použit pro transfekci vhodné buněčné linie.

Preferované Fab fragmenty podle vynálezu jsou "humanizované", takže jsou méně antigenní při podání lidem než Fab fragmenty, které jsou produkovány přímo ze zvířecí, preferovaně myší, mAb. Způsob, kterým jsou humanizované Fab fragmenty podle vynálezu produkovány není zásadní. Jakékoliv běžné prostředky v oboru známé mohou být použity. Takové metody využívají skutečnosti, že imunoglobulin (Ig), jako je monoklonální protilátka, se skládá z konstantní domény a variabilní domény, na které se vyskytuje místo vazby antigenu. Variabilní doména se skládá ze šesti komplementaritu určujících regionů ("CDR") uložených v regionu pracovního rámečku (tři CDR na lehké a těžkém řetězci Ig). (42). Jsou to CDR, které jsou zodpovědné za specifitu mAb. Protože mAb jsou myšího nebo jiného zvířecího původu je provedena humanizace mAb v podstatě nahrazením alespoň jednoho, nebo lépe všech šesti, CDR lidského imunoglobulinů korespondujícími CDR zvířecí mAb mající požadovanou specifitu. Tak slouží lidský Ig jako pracovní rámeček pro zvířecí CDR. V takových postupech je zvířecí mAb, obvykle myší, popisována jako "donor" a lidský Ig je

označován jako "akceptor".

Další "doladění" aminokyselinové sekvence humanizovaných mAb jak je popsáno v oboru může také být provedeno pro optimalizaci specificity humanizované mAb pro antigen. Například, publikovaná mezinárodní patentová přihláška č. WO 90/7861 objasňuje, že by měl být vyšetřován panel 10 - 20 lidských Ig a ten lidský Ig, jehož variabilní region má nejvyšší stupeň homologie s variabilním regionem myšního dárce mAb, typicky 65% - 70% nebo vyšší homologii, by měl být použit jako akceptor. Další substituce donor aminokyselin za akceptor aminokyseliny (typicky okolo tři substitucí) mohou být provedeny mimo CDR na základě čtyř kritérií popsaných v WO 90/7861 na str. 12 - 15.

V jiném příkladu humanizace známém v oboru objasňuje EP 0 620 276 hierarchii jednotlivých substitucí, které mohou být provedeny na Ig akceptoru mimo přenesené CDR dárce tak, aby se zvýšila specifita humanizované mAb. Takové substituce jsou popsány jako vyhýbající se nutnosti selektování Ig lidského akceptoru, jehož variabilní region má vysoký stupeň homologie s variabilním regionem mAb donoru. Specifický protokol pro humanizaci je poskytnut v EP 0 620 276 na str. 8 - 9.

Metody pro generování DNA sekvencí pro expresi humanizovaných intaktních mAb v hostitelských buňkách využitelné pro získání Fab fragmentů podle vynálezu, nebo pro expresi humanizovaných Fab fragmentů podle vynálezu, jsou v oboru známé a nejsou zásadní. Takové metody zahrnují, například, místně řízenou mutagenesi, konstrukci celých

variabilních regionů za použití přesahujících oligonukleotidů, které inkorporují zvířecí CDR na lidský rámeček, a použití PCR přenosu. (WO 90/7861, EP 0 620 276, odk. 43).

Tak může být vynález dále popsán jako Fab fragment obsahující imunoglobulinový Fab fragment a šest komplementaritu určujících regionů, které jsou obsaženy v uvedeném imunoglobulinovém Fab fragmentu, kde jeden až šest z uvedených komplementaritu určujících regionů jsou komplementaritu určující regiony monoklonální protilátky mající následující vlastnosti:

- 1) monoklonální protilátka se váže na první doménu HLA-DR,
- 2) monoklonální protilátka je cytotoxická pro antigen prezentující buňky, které exprivují HLA-DR,
- 3) monoklonální protilátka snižuje HLA-DR expresi na antigen prezentujících buňkách.

Preferovaným provedením vynálezu je humanizovaný Fab fragment kde, v souladu s výše uvedeným, je imunoglobulinovým Fab fragmentem je lidský fragment a monoklonální protilátka mající vlastnosti 1 - 3 je zvířecí, preferovaně myší. Tento humanizovaný Fab fragment může být lidský imunoglobulinový Fab fragment, ve kterém bylo jeden až šest CDR v něm obsažených nahrazeno korespondujícími CDR zvířecí mAb. Tak je preferovaným Fab fragmentem podle vynálezu Fab fragment obsahující lidský imunoglobulinový Fab

fragment a šest komplementaritu určujících regionů, které jsou obsaženy v uvedeném lidském imunoglobulinovém Fab fragmentu, kde jeden až šest z komplementaritu určujících regionů jsou komplementaritu určující regiony monoklonální protilátky mající vlastnosti 1 - 3, výše.

Je preferováno, aby tento humanizovaný Fab fragment podle vynálezu obsahoval všech šest zvířecích mAb CDR.

V případě, že imunoglobulinový Fab fragment je zvířecího původu je uvažováno, že Fab fragment podle vynálezu může být Fab fragment monoklonální protilátky, sám o sobě, který má vlastnosti 1 - 3, výše. Takový Fab fragment bude užitečný jako intermediát pro použití při získání zvířecích CDR, které budou obsaženy v preferovaném humanizovaném Fab fragmentu podle vynálezu.

Preferované Fab fragmenty podle vynálezu mají podobné vlastnosti jako Fab fragmenty získané z monoklonálních protilátek LB3.1, L243, SFR3-DR5 a 1-1C4, jak jsou popsány výše. Protože Fab fragmenty podle vynálezu inhibují aktivaci Th buněk, mohou být použity v léčbě různých chorob, ve kterých jsou aktivované Th buňky zdrojem poškození chorobou nebo příznaků. Jednou z takových chorob je revmatoidní artritida. (33). Snížení exprese HLA-DR na APC u pacienta s revmatoidní artritidou, a tím inhibování aktivace Th buněk u takového pacienta, může zpomalit nebo zastavit progresi choroby. Inhibování aktivace Th buněk u pacienta s revmatoidní artritidou může také zmírnit příznaky, jako je bolest a zánět, snížením nebo zastavením uvolňování mediátorů, které jsou příčinou těchto příznaků.

Tak vynález také obsahuje Fab fragment jak je zde popsán a jeho použití jako terapeuticky aktivního agens a přesněji jako imunosuprivujícího agens pro léčbu revmatoidní artritidy a metodu pro suprivování imunitní odpovědi u pacienta obsahující podání terapeuticky účinného množství Fab fragmentu podle vynálezu pacientovi, který potřebuje takovou léčbu. Vynález dále obsahuje metodu pro léčbu revmatoidní artritidy u pacienta podáním terapeuticky účinného množství Fab fragmentu podle vynálezu pacientovi, který potřebuje takovou léčbu. Množství podaného Fab fragmentu může být určeno běžnými prostředky. Také podání Fab fragmentu podle vynálezu může být provedeno jakýmikoliv běžnými prostředky.

Podání Fab fragmentu podle vynálezu je preferovaně provedeno za použití farmaceutické kompozice podle vynálezu (popsané níže). Podání je preferovaně provedeno parenterálně (subkutánně, intramuskulárně nebo intravenosně), zejména intravenosně. Dávka požadovaná pro inhibici aktivace Th buněk u pacienta, a tak pro léčbu revmatoidní artritidy, může být určena jakýmikoliv běžnými prostředky, například klinickým zkoušením limitující dávky. Nicméně, dávka okolo 1 - 10 mg/den i.v., zejména okolo 3 - 7 mg/den, a ještě lépe okolo 5 mg/den je preferována (34, 35), a je preferovaně podána jako bolus. Léčba je preferovaně jedenkrát denně po jeden týden nebo méně, nicméně denní léčba může pokračovat po více než tři týdny, pokud je to nezbytné.

Fab fragmenty podle vynálezu mohou být formulovány jako kapalně farmaceutické kompozice, např. pro parenterální

podání obsahující Fab fragment podle vynálezu rozpuštěný v běžném farmaceuticky akceptovatelném kapalném materiálu nosiče. Kompozice může dále obsahovat jiné farmaceuticky akceptovatelné aktivní substance. Preferovaně obsahuje kompozice okolo 0,5 - 5 mg/ml Fab fragmentu podle vynálezu, zejména okolo 1 - 2 mg/ml. Preferovaný kapalný nosič je sterilní fyziologický salinický roztok.

Výsledky popsané níže v příkladech 1 - 7 ukazují, že inhibice aktivace Th buněk HLA-DR- specifickou mAb může být způsobena několikerým dějem: a) eliminací dostupných APC přímou cytotoxicitou, b) redukcí dostupných HLA-DR molekul na přežívajících APC snížením exprese na povrchu buněk, c) bráněním interakce třídy II MHC - TcR. Inhibice Th buněk se může také vyskytnout prostřednictvím mAb blokování peptidové vazebné drážky na Dr molekule, což jí činí nedostupnou pro antigen (30). Je proto nepochopitelné, proč jsou mAb vyšší inhibitory Th buněk než nynější antagonisté peptidů, jejichž účinek je výlučně založen na blokování vazebného místa pro antigen na HLA-DR molekulách.

Mechanismus průběhu cytotoxicity a snížení exprese třídy II zůstává předmětem výzkumu. Nicméně, je jasné, že cytotoxicita vyžaduje zkříženou vazbu, zatímco snížení exprese je dosaženo monovalentními Fab fragmenty podle vynálezu bez cytotoxicity původní mAb. Tento rozdíl umožňuje separaci těchto dvou vlastností fragmentací protilátky. Za předpokladu, že dříve pozorované vedlejší účinky Ab proti třídě II (7, 8) byly alespoň částečně asociovány s přímou cytotoxicitou mohou Fab fragmenty podle vynálezu sloužit pro terapeutické použití těchto protilátek jako imunosupresorů,

bez vedlejších účinků.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

#### Isotypová specifita anti-DR mAb

Přesné specifity mAb byly určeny jejich schopností barvit myší buněčné linie transfektované geny třídy II lidských HLA.

Metody: Myší fibroblastové linie transfektované ukázanými lidskými geny třídy II (15), stejně jako netransfektované hostitelské buňky (Lmtk<sup>-</sup>) byly barveny standardní nepřímou imunofluorescencí za použití DR- specifické mAb a FITC-konjugovaného kozí anti-myšího Ig (Southern, Birmingham, Alabama) jako primárního a sekundárního reagens, v příslušném pořadí. Vzorky byly analyzovány na FACScan průtokovém cytometru (Becton-Dickinson, San Jose, California). Výsledky jsou ukázány v tabulce 1. "+" a "-", přítomnost a nepřítomnost testované protilátky, v příslušném pořadí; "NT", netestováno.

Závěr: Protilátky 8D1, 9F1, 9F2 a 10F12 jsou pan-DR specifické, zatímco 1-1C4 mohou rozpoznávat všechny tři izotypy lidské třídy II (DR, DP a DQ).

Tabulka 1. Barvení vzorků pan-DR specifické mAb

Myši

Lm tk-	Expriřovaná HLA třída II	mAb				
		1-1C4	8D1	9F1	9F2	10F12
L57.23	DR A*0101/ DR B1*0101	+	NT	+	+	+
L243.6	DR A*0101/ DR B1*0401	+	+	+	+	+
L164.11	DR A*0101/ DR B1*0402	+	NT	NT	NT	NT
L259.1	DR A*0101/ DR B1*0403	+	NT	NT	NT	NT
L300.7	DR A*0101/ DR B1*0404	+	NT	+	NT	NT
L241.2	DR A*0101/ DR B1*0701	+	NT	+	NT	NT
L91.7	DR A*0101/ DR B1*1101	+	NT	+	+	+
L167.2	DR A*0101/ DR B1*1401	+	NT	NT	NT	NT
L182.1	DR A*0101/ DR B1*1402	+	NT	NT	NT	NT
L105.1	DR A*0101/ DR B3*0202	+	NT	NT	NT	+
L168.2	DR A*0101/ DR B3*0101	+	NT	NT	NT	NT
L257.6	DR A*0101/ DR B4*0101	+	NT	NT	NT	NT

L.256.12	DPAI*0202X/ DPBI*0201	+	NT	NT	NT	NT
L.25.4	DPAI*0103/ DPBI*040X	+	-	-	-	-
L.21.3	DQAI*0201/ DQBI*0602	+	NT	NT	NT	NT

## Příklad 2

## Specifita řetězců a domén anti-HLA-DR mAb

Metody: Za použití standardních metod klonování genů, rekombinace a transfekce (10) byly generovány dvě myší buněčné linie exprivující chimerické lidské/myší molekuly třídy II. Transfektant M12.C3.25 byl odvozen od myší třída II negativní hostitelské buněčné linie M12.C3 (15) a exprivuje MHC produkt složený z  $\alpha 1$  a  $\beta 1$  domén odvozených od lidského HLA-DRA\*0101/DRB1\*0401 molekuly, a  $\alpha 2$  a  $\beta 2$  domény myšího I-E<sup>d</sup> proteinu, na který se neváží DR-specifická reagens. Transfektant CH27.105 byl odvozen od myší třída II pozitivní hostitelské buněčné linie CH27 (16) a exprivuje původní myší E $\beta^k$  řetězec asociovaný s chimerickým lidským/myším  $\alpha$  řetězcem popsáným výše. Standardní nepřímé imunofluorescenční barvení bylo provedeno za použití značeného IgG<sub>2</sub> a IgG<sub>1</sub> protilátek, v konjunkci s proteinem A-FITC (Boehringer, Mannheim, Germany) a kozím anti-myším IgG<sub>1</sub>-FITC (Southern, Birmingham, Alabama), v příslušném pořadí. Vzorky byly analyzovány na FACScan průtokovém cytometru (Becton - Dickinson, San Jose, California). Výsledky jsou ukázány v tabulce 2 (presentace je jako v tabulce 1).

Závěr: Výsledky potvrzují dříve popsanou DR $\alpha 1$  specifitu LB3.1 a L243 (10). Protilátky 8D1 a 1-1C4 jsou  $\beta 1$ -specifické, zatímco epitop rozpoznávaný CCCL20 se zdá být  $\beta 2$  doména. Zbývající reagens (9F1, 9F2, 10F12) se pravděpodobně váží na determinanty exprivované druhou HLA-DR doménou. Korespondující epitop anti-DRB\*110X mAb nemůže být mapován

za použití těchto transfektantů, protože SFR3-DR5  
nerozpoznává DRB\*0401 alotyp.

Tabulka 2. Vazba anti-DR mAb na myší linie B buněk transfektované chimerickými lidskými-myšími rekombinantními geny třídy II

myší buněčná linie	M12.C3	M12.C3.25	CH27	CH27.105
Exprese lidských				
třídy II odvozených				
proteinů		DR $\alpha$ 1-E $\alpha$ 2/DR $\beta$ 1- E $\beta$ 2	-	DR $\alpha$ 1-E $\alpha$ 2/E $\beta$ 1-E $\beta$ 2
mAb:	-	+	-	+
LB3.1				
L243	-	+	-	+
I-1C4	-	+	-	-
8D1	-	+	-	-
9F1	-	-	-	-
9F2	-	-	-	-
10F12	-	-	-	-
CCCL20	-	-	NT	NT

Účinek anti-DR mAb a jejich fragmentů na HLA-DR expresi a přežívání buněk.

DR exprese a přežívání antigen prezentujících buněk (APC) prekultivovaných s buď DR-vážitím kompetitorním peptidem aXA (17), nebo DR-specifickou mAb byla vyšetřována v příslušných koncentracích, které v případě aXA a dvou mAb (LB3.1, 1-1C4), blokovaly prezentaci antigenu Th buňkám. Jako APC byla použita virem Epstein-Barr transformovaná lidská B-lymfoblastická buněčná linie (EBV-LCL).

### Příklad 3

Účinky DR vážitím kompetitorního peptidu a DR-specifické mAb na EBV-LCL.

Metody: EBV-LCL (Priess, ECACC (Salisbury, UK) přírůstkové č. 86052111) ( $10^5$  buněk/ml) byly kultivovány za přítomnosti DR-specifické mAb (LB3.1, 1-1C4, CCCL20) nebo peptidu aX-A (aXAAAKTAAAA-NH<sub>2</sub>; odk. 17) v koncentracích ukázaných na obrázku 1 po 16 hodin. Buňky byly následně promyty a barveny standardní nepřímou fluorescencí za použití DR-specifické mAb (LB3.1 (a), CCCL20 (b), 1-1C4 (c)) a FITC-konjugované kozí anti-myší Ig (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, Alabama), jako primárního a sekundárního reagens, v příslušném pořadí. Vzorky byly analyzovány na FACScan průtokovém cytometru (Becton - Dickinson, San Jose, California). Výsledky jsou ukázány na obrázku 1. Osa X reprezentuje HLA-DR expresi a osa Y fluorescenci propidiumjodidem barvených mrtvých buněk, oboje v arbitrážních jednotkách fluorescence. "Pozadí"

representuje kontrolní populaci buněk kultivovanou po 16 hodin v normálním mediu a následně značenou primárním reagens, v příslušném pořadí.

Závěr: Kokultivace s peptidem aXA (Obr. 1a) neovlivňuje signifikantně ani přežívání buněk, ani DR expresi, zatímco DR specifická mAb LB3.1 (obr. 1A) a 1-1C4 (obr. 1c) indukují vysokou cytotoxicitu, stejně jako redukovanou expresi DR na přežívajících buňkách. Nicméně, tyto vlastnosti nebyly sdíleny všemi anti DR mAb, protože CCCL20 neovlivňuje ani přežívání, ani DR expresi, a to ani ve zvýšené koncentraci (obr. 1b).

DR downmodulace a cytotoxicita na EBV-LCL může být indukována dvěma dalšími DR specifickými mAb, L243 a SFR-DR5. zatímco čtyři další anti-DR mAb (8D1, 9F1, 9F2 a 10F12) nebyly ani cytotoxické, ani neredukovaly DR expresi (data nejsou ukázána).

#### Příklad 4

Časový průběh modulačního a cytotoxického účinku mAb L243 na LG2.

Metody: EBV-LCL LG2 (Istituto Nazionale Per La Ricerca Sul Cancro (Genova, Italy), přírůstkové č. G201 12301) ( $10^5$  buněk/ml) byly kultivovány za přítomnosti Dr-specifické mAb L243 (Becton-Dickinson) v koncentraci 10 nM po ukázanou časovou periodu. Buňky byly následně promyty a barveny standardní nepřímou fluorescencí za použití DR-specifické mAb L243 a FITC-konjugované kozí anti-myší Ig (Southern, Birmingham, Alabama), jako primárního a sekundárního

reagens, v příslušném pořadí. Mrtvé buňky byly barveny propidiumjodidem a vzorky byly analyzovány na FACScan průtokovém cytometru. Výsledky jsou ukázány na obrázku 2. Histogramy reprezentují relativní počet mrtvých buněk (světlé) a živých buněk exprimujících snížené množství HLA-DR (tmavé).

Závěr: In vitro studie kinetiky ukázaly detekovatelnou cytotoxicitu mAb po 2 hodinách, a plató toxicity po 8 hodinách. Snížená exprese Dr se stala detekovatelnou po 4 hodinách a dosáhla svého vrcholu po 8 hodinách.

#### Příklad 5

Trvání modulačních a cytotoxických účinků L243 na LG2 po odstranění mAb

Metody: EBV-LCL LG2 ( $10^5$  buněk/ml) byly kultivovány za přítomnosti Dr-specifické mAb L243 (Becton-Dickinson) v koncentraci 10 nM po ukázanou časovou periodu. Protilátka byla odstraněna 3x promytím a buněčná kultura pokračovala ve stejném objemu čerstvého media, jak je ukázáno. Buňky byly následně promyty a barveny standardní nepřímou fluorescencí za použití DR-specifické mAb L243 a FITC-konjugované kozí anti-myší Ig (Southern, Birmingham, Alabama), jako primárního a sekundárního reagens, v příslušném pořadí. Mrtvé buňky byly barveny propidiumjodidem a vzorky byly analyzovány na FACScan průtokovém cytometru. Výsledky jsou ukázány na obrázku 3.

Histogramy reprezentují relativní počet mrtvých buněk

(světlé) a živých buněk exprivujících snížené množství HLA-DR (tmavé).

Závěr: Protilátkami indukovaná snížená exprese DR trvá po 16 hodin po odstranění mAb

#### Příklad 6

Snížená HLA-DR exprese v různých APC populacích po kokultivaci s DR-specifickou mAb L243 a jejími fragmenty.

Dále byl vyšetřován účinek anti DR mAb na různé netransformované MHC třída II pozitivní buněčné subpopulace: klidové a aktivované B buňky, monocyty/makrofágy a aktivované Th buňky.

Metody: Izolace B buněk a monocytů/makrofágů z čerstvé periferní krve byla provedena odebráním T buněk plus monocytů nebo B buněk (kde to bylo aplikovatelné) před kultivací, za použití magnetických korálek (Dynal) předem potažených mAb specifickou pro CD3 (SK7) a CD14 (MØP9) nebo CD19 (4G7), v příslušném pořadí (Becton.Dickinson). Th a blasty B buněk byly generovány 3 - 5 denní in vitro stimulací mononukleárních buněk periferní krve s fytohemaglutininem (1 µg/ml; Sigma) a mitogenem líčidla amerického (2,5 µg/ml; Sigma), v příslušném pořadí. L243 byla trávena pepsinem a papainem, aby se izolovali F(ab)<sub>2</sub> a Fab fragmenty, v příslušném pořadí, jako v odk. 18. Netrávené protilátky a jejich Fc fragmenty byly odstraněny afinitní chromatografií na protein G kolonách. APC (10<sup>5</sup> buněk/ml) byly kultivovány za přítomnosti ekvivalentních

koncentrací kompletní L243 protilátky (10 nM) nebo jejího F(ab)'<sub>2</sub> (10 nM) a Fab (20 nM) fragmentů po 16 hodin, jak je ukázáno na obrázku 4. Buňky byly potom promyty a barveny jako v příkladu 3. Výsledky jsou ukázány na obrázku 4. X osa representuje HLA-DR expresi a osa Y fluorescenci propidiumjodidem barvených mrtvých buněk, oboje v arbitrážních jednotkách fluorescence. Čísla ukazují procento buněk v korespondujících kvadrantech. "DR-FITC barvení" a "pozadí FITC barvení" representují kontrolní buněčné populace kultivované po 16 hodin v normálním mediu a následovně značené s a bez primárního reagens, v příslušném pořadí.

Závěr: Exprese DR molekul na povrchu buněk se snížila ve všech populacích za přítomnosti kompletní mAb, stejně jako za přítomnosti jejich bi- a monovalentních fragmentů F(ab)'<sub>2</sub> a Fab, v příslušném pořadí. Rozsah DR redukce byl vyšší u B buněk (80 - 90%), střední u monocytárních APC (50 - 65%) a nízký (méně než 50%) u Th buněčných blastů. Kokultivace EBV-LCL a preaktivovaných blastů B buněk s bivalentním anti-DR reagens (kompletní mAb a F(ab)'<sub>2</sub>) vedla k vysoké (60 - 70%) a marginální (5 - 15%) cytotoxicitě, v příslušném pořadí, zatímco monovalentní fragmenty indukovali pouze snížení exprese bez signifikantních smrtí buněk. Cytotoxický účinek byl kompletně nepřítomen u subpopulací klidových B buněk, aktivovaných Th lymfocytů a monocytů/makrofágů preinkubovaných s jakoukoliv formou DR-specifických mAb použitých v těchto pokusech.

Podobné profily (částečně ukázané v dalších sekcích) byly získány za použití kompletních mAb 1-1C4 a LB3.1 a jejich

Fab fragmentů. (F(ab)'<sub>2</sub> fragment LB3.1 protilátky nemůže být generován, jelikož její izotyp nedovoluje trávení papainem).

#### Příklad 7

Účinky zvýšených koncentrací DR specifických Fab fragmentů na EBV transformovanou B buněčnou linii LG2.

Rozdíl ve smyslu cytotoxicity mezi mono- a bivalentními mAb reagens byly zkoumány pro určení toho, zda je to pouze rozdíl kvantitativní, nebo je-li způsoben kvalitativně odlišným mechanismem účinku.

Metody: Jako v příkladech 3 a 6. Výsledky jsou ukázány na obrázku 5. Presentace je jako na obrázku 1.

Závěr: Zvýšené koncentrace L243-Fab selhaly v indukci jakéhokoliv signifikantního snížení přežívání APC.

#### Příklad 8

Účinky prolongované kokultivace L243 a jejích fragmentů na LG2 buňky

Metody: APC ( $10^5$ /ml) byly kultivovány za přítomnosti ekvivalentních koncentrací kompletní L243 protilátky (10 nM) nebo jejího Fab fragmentu (20 nM) po ukázanou dobu. Buňky byly poté promyty a barveny jako v příkladu 6. Výsledky jsou ukázány na obrázku 6. Presentace je jako na obrázku 2.

Závěr: Prolongovaná kokultivace selhala v indukci

jakéhokoliv signifikantního snížení přežívání APC.

#### Příklad 9

#### Cytotoxicita EBV-LCL závisí na DR-překřížení

Metody: EBV-LCL (Priess) ( $10^5$  buněk/ml) byly kultivovány po 16 hodin za přítomnosti L243 Fab (20 nM) fragmentů a kozím anti-myším IgG předem potažených magnetických korálek ("anti-Ig"; Dynal), tak, aby došlo k překřížení na buněčnou membránu navázaných Fab fragmentů, jak je ukázáno. Buňky byly poté promyty a barveny jako v příkladu 6. Výsledky jsou ukázány na obrázku 7. Presentace je jako na obrázku 1.

Závěr: Překřížení HLA-DR vázaných Fab generuje cytotoxický účinek na EBV-LCL.

Z těchto výsledků dosud popsanych lze usoudit, že:

- a) HLA-DR exprivované na jakýchkoliv mononuklerních krevních buňkách může být downregulován a ligací specifické mAb;
- b) neočekávaně, DR ligace monovalentního reagens (Fab) může také vést k DR downregulaci;
- c) protože je cytotoxicita zjevná pouze na EBV, modelu aktivovaných B buněk, mitogenem preaktivovaných B buněk, je pravděpodobně závislá na aktivačním stavu B buněk; a
- d) cytotoxicita je následek DR-překřížení bivalentními

ligandy (kompletní mAb a F(ab)'<sub>2</sub>, překřížené Fab), a nevyžaduje Fc část protilátky.

Předchozí studie ukázaly, že ligace třídy II molekul s celou mAb nebo receptory T buněk signalizuje serii změn v APC jako je sekrece cytokinů (19 - 20), modulace buněčného růstu a sekrece imunoglobulinů (21 - 28), upregulace kostimulačních (15) a buněčných adhezních molekul (20, 29) a downregulace CD23 (25). Bylo proto důležité stanovit, zda je snížení DR exprese za prekultivace s mAb omezeno na třídu II molekul ligovaných protilátkou, nebo jestli je to součást globálně indukované downregulace množství proteinů buněčného povrchu. Expresе HLA třída II izotypů DP a DQ, HLA třída I molekul a MHC nepříbuzného adhezního proteinu CD18 byla analyzována na různých subpopulacích APC po kokultivaci s F(ab)'<sub>2</sub> nebo Fab fragmenty L243.

#### Příklad 10

Selektivita DR downregulace na klidové B buňky a monocyty/makrofágy

Metody: Jako v příkladu 6. standardní nepřímé imunofluorescenční barvení mAb specifickou pro HLA-DP (klon B7/21), -DQ (SK10), CD18 (L130) (vše IgG<sub>1</sub> podtřídy, Becton - Dickinson) a anti-HLA třída I (W6-32 IgG<sub>2a</sub>, Accurate, Westbury, New York) reagens byla použita v konjunkci s kozím anti myším IgG<sub>1</sub>-FITC a FITC značeným proteinem A (Boehringer, v příslušném pořadí. Tento postup vylučuje další nepřímé FITC značení residuálního na membránu vázaného DR specifického protilátkového fragmentu. Výsledky jsou ukázány

na obrázku 8. Presentace je jako na obrázku 4. "Kontrola" reprezentuje buněčnou populaci kultivovanou po 16 hodin v normálním mediu a následně značenou proteinem A a FITC konjugovaným kozím anti myším IgG<sub>1</sub> společně.

Závěr: Zatímco DR molekuly vykazovaly redukovanou expresi, DP, DQ, třída I a CD18 molekuly zůstávaly bez ovlivnění jak v klidových B buňkách, tak v monocytech/makrofágách prekultivovaných s F(ab)'<sub>2</sub> fragmenty.

#### Příklad 11

Selektivita DR downregulace na B buněčné blasty

Metody: Jako v příkladu 10. Výsledky jsou ukázány na obrázku 9. Presentace je jako na obrázku 4.

Závěr: Zatímco DR molekuly byly downregulovány, DP, DQ, třída I a CD18 molekuly zůstávaly bez ovlivnění B buněčných blastech prekultivovaných s F(ab)'<sub>2</sub> fragmenty.

#### Příklad 12

Selektivita DR downregulace na LG2 buňky

Metody: Jako v příkladu 10. Výsledky jsou ukázány na obrázku 10. Presentace je jako na obrázku 4.

Závěr: Zatímco exprese DR molekul se zdá být selektivně redukována ligací Fab, bivalentní F(ab)'<sub>2</sub> fragmenty indukují

signifikantní downregulaci jiných izotypů třídy II, třídy I molekul a CD18. Protože úroveň neselektivní redukce je pouze dvojnásobná a DR redukce je desetinásobná je možné předpokládat, že snížení exprese jiných molekul buněčného povrchu je asociováno s obecnou škodlivostí bivalentních reagens na EBV-LCL.

### Příklad 13

#### Alotypová neselektivita DR downregulace mAb

Modulační mAb LB3.1, L243 a 1-1C4 jsou pan-DR specifické, t.j. nerozlišují mezi různými alelickými formami HLA-DR. Proto nejsou vhodné pro testování alotypové specificity DR downregulace. Nicméně, tato otázka může být zodpovězena za použití downregulační mAb SFR3-DR5, která je exklusivně specifická pro DRB1\*110X (dříve DR 5; odk. 13).

Metody: B buňky (izolované z čerstvé periferní krve heterozygotního DRB1\*0101/1101X dárce jako v příkladu 6) byly kultivovány za přítomnosti DRB1\*110X - specifické mAb SFR3-DR5 (20% tekutina supernatantu hybridomu; odk. 14). Buňky byly následně promyty a barveny standardní nepřímou imunofluorescencí s buď DRB1\*110X - specifickou mAb SFR3-DR5 nebo s DRB1\*110X - specifickou mAb CCCL20 (12), v konjunkci s kozím anti myším a krysím Ig (Southern), jak je ukázáno. Výsledky jsou ukázány na obrázku 11. Presentace je jako na obrázku 4.

Závěr: DRB1\*110X - specifické reagens SFR3-DR5 indukovalo downregulaci obou DR alomorfů exprivovaných heterozygotními

klidovými B buňkami a také ovlivňovalo DR alotyp nerozpoznaný mAb. Tak se DR downregulace nezdá být alotyp specifickou.

#### Příklad 14

Pan-třída II downregulace na TS-10 buňkách účinkem 1-1C4 Fab.

Protože mAb 1-1C4 může rozpoznávat  $\beta$  řetězec všech tří izotypů HLA třída II (Dr, DP, DQ), bylo významné testovat, zda je schopná shodně redukovat jejich expresi.

Metody: EBV-LCL TS-10 (ECACC (Salisbury, UK) přírůstkové č. 85102911) byly kultivovány za přítomnosti 1-1C4 Fab (20 nM), anti-DP mAb (10 nM) nebo anti-DQ mAb (10 nM) po 16 hodin, jak je ukázáno. Buňky byly následně promyty a barveny jako v příkladu 6 a 10. Výsledky jsou ukázány na obrázku 12. Histogram profilu barvení živých buněk jsou ukázány. Osa X reprezentuje intenzitu fluorescence v arbitrážních jednotkách a osa Y relativní počet buněk. Otevřené histogramy reprezentují kontrolní buněčné populace značené příslušným sekundárním činidlem.

Závěr: 1-1C4 downreguluje expresi všech tří izotypů třídy II (DR, DP, DQ) s redukcí intenzity srovnatelnou s redukcí dosaženou pro izotyp specifickou mAb (anti-DP, anti-DQ). Tato downmoduace pan-třídy II 1-1C4 byla selektivní, protože HLA třída I a CD 18 molekuly zůstávaly neovlivněny. Proto kromě využitelnosti pro léčbu HLA-DR-spoených indikací jako je revmatoidní artritida,

mohou být Fab fragmenty podle vynálezu získané z pan-třídy II mAb jako je 1-1C4 užitečné pro léčbu chorob spojených s HLA-DP a -DQ expresí, jako je roztroušená sklerosa, diabetes mellitus typ I, myastenia gravis, lupus erythematosus, rejekce orgánového transplantátu a reakce štěpu proti hostiteli (odk. 36 - 41).

#### Příklad 15

Nedostatek TNF $\alpha$  sekrece se zvyšuje při kokultivaci LG2 a Priess buněk s L243 a jejími fragmenty

Předešlé studie ukázaly, že překřížení DR molekul L243 na EBV transformované B buněčné linii JY zvyšuje sekreci TNF $\alpha$  (20). Protože toto může být možný mechanismus pro cytotoxicitu, bylo měřeno uvolňování TNF $\alpha$  Priess a LG2 buňkami kokultivovanými se stejnou mAb L243 a jejími fragmenty.

Metody: APC ( $10^5$  buněk/ml) byly kultivovány za přítomnosti ekvivalentních koncentrací kompletní L243 protilátky (10 nM) nebo jejího F(ab)'<sub>2</sub> (10 nM) a Fab (20 nM) fragmentů po 16 hodin, jak je ukázáno. Koncentrace TNF $\alpha$  v supernatantech kultury byla měřena za použití vnitřně kontrolovaného standardního ELISA kitu (T cell Diagnostic, Cambridge, Massachusetts). Cytotoxické a DR modulační účinky monoklonálních reagens byly potvrzeny imunofluorescencí jako v příkladu 4 (data nejsou ukázána). Výsledky jsou ukázány na obrázku 13.

Závěr: Žádné signifikantní zvýšení TNF $\alpha$  nebylo detekováno

v těchto kulturách. Proto zůstává mechanismus cytotoxicity stejně jako selektivní DR downregulace předmětem výzkumu.

Inhibice odpovědi T buněk působením anti DR mAb a jejich fragmentů

#### Příklad 16

Inhibice odpovědi T buněk anti-DR mAb, jejich fragmenty a DR vážícími peptidy

Metody: CD4 pozitivní klony Th buněk NBHAC25, KMHA25 a DSHABB10 připravené podle odkazu 32 odpovídají na hemaglutininový (HA) peptid viru chřipky HA307-319 (PKYVKQNTLKLAT) presentovaný DRA/DRB1\*0101, DRA/DRB1\*0401 a DRA/DRB1\*0401, v příslušném pořadí. Buňky byly inkubovány s mitomycinem C ošetřenými APC, antigenem (134 nM) a inhibitory. Antigen specifická proliferace Th buněk byla měřena standardním testem inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu. Výsledky jsou ukázány v tabulce 3.

Závěr: mAb LB3.1, L243 a 1-1C4, t.j. ty, které indukovaly downregulaci DR molekul byly také silnými inhibitory aktivace Th buněk. Oproti tomu mAb, které neměly downregulační účinek na DR (CCCL20, 8D1, 9F1, 9F2, 10F12) selhaly také v ovlivnění odpovědi Th buněk, nebo indukovaly marginální inhibiční účinek (Tabulka 3). Tak schopnost DR downregulace koreluje s inhibiční aktivitou. Kromě toho tyto výsledky ukazují, že downregulační mAb mají tendenci k rozpoznávání epitopů umístěných na peptidových vazebných ( $\alpha 1$  a  $\beta 1$ ) doménách molekul třídy II.

Tabulka 3. Inhibice odpovědi T buněk anti-DR mAb, jejími fragmenty a DR-vazíacími se peptidy

Th klon	APC: DRB1* <sub>a</sub>	Antigen domény	Inhibitor	DR specifita	DR down- regulation	Max. % Inhibit. <sup>b</sup>	Biologická aktivita inhibitoru	
							IC <sub>50</sub> <sup>c</sup> (or nM)	IC <sub>94</sub> <sup>d</sup> (or range; nM)
NBHAC25	IG2:0101	IIA307-319	LB3.1 mAb	α1	+	100	3-8	6-60
			LB3.1 Fab	α1	+	100	2-8	20-120
			PHMC:0101	IIA307-319	α1	+	100	0.9
Native IIA	IG2:0101	IIA307-319	LB3.1 Fab	α1	+	100	70	500
			LB3.1 mAb	α1	+	100	<0.1	0.6
			LB3.1 Fab	α1	+	100	0.8	60
F(ab)' <sub>2</sub>	IG2:0101	IIA307-319	I.2.4.3 mAb	α1	+	100	3-8	6-20
			I.2.4.3	α1	+	100	4	30
			I.2.4.3 Fab	α1	+	100	7-40	40-180
mAb	IG2:0101	IIA307-319	1-1C4 mAb	β1	+	100	1-4	6-20
			1-1C4 Fab	β1	+	100	4-12	20-60
mAb	IG2:0101	IIA307-319	CCCL20	β2	-	0-26	N/A <sup>c</sup>	N/A
			8D1 mAb	β1	-	0-18	N/A	N/A
			9F1 mAb	2	-	31-38	N/A	N/A
peptidef	IG2:0101	IIA307-319	9F2 mAb	2	-	42-47	N/A	N/A
			10F12 mAb	2	-	42-52	40	N/A
			aXA/aXRA	α1β1	-	48-78	240- 270,000 <sup>g</sup>	N/A

	m/1-8 peptidch	$\alpha$ 1 $\beta$ 1	-	74	2,100	N/A
KMH1A25	HA307-319 LB3.1 mAb	$\alpha$ 1	+	100	1.8-3	6-20
	0401					
	PBMC: 0401 Native IIA LB3.1 mAb	$\alpha$ 1	+	100	0.1	0.6
DSH1BB10	HA307-319 LB3.1 mAb	$\alpha$ 1	+	100	4	18
	0401					
	I-1C4 mAb	$\beta$ 1	+	100	3.8	20
	I-1C4 Fab	$\beta$ 1	+	100	17	80
	I.243 Fab	$\alpha$ 1	+	100	18	180

- a DR molekula, která prezentuje antigen Th klonům
- b Dosaženo při 60 nM pro mAb a její fragmenty, a 10  $\mu$ M pro peptidové antagonisty
- c Koncentrace požadovaná pro 50% inhibici antigen specifické proliferativní odpovědi. Horní a dolní hodnoty ze 3 až 4 pokusů.
- d Koncentrace požadovaná pro 94% inhibici antigen specifické proliferativní odpovědi. Horní a dolní hodnoty ze 3 až 4 pokusů.
- e Není aplikovatelné: IC<sub>50</sub> a IC<sub>94</sub> nemohou být stanoveny, protože měřené hladiny inhibice byly nižší než 50% a 94%, respektive.
- f aXA (peptid CY760.50, aXAAAKTAAAA-NH<sub>2</sub>; odk. 17) a aXRA (aXRAMKTIAAAA-NH<sub>2</sub>) ekvivalentní pro inhibiční kapacitu T buněk.
- g V závislosti na zavedeném antigenu (HA307-319 od 13,4 pM do 134 nM).

h Ac-YRAMATLA-NH<sub>2</sub>.

### Příklad 17

Požadovaná koncentrace protilátek pro inhibici Th buněk a DR downregulaci

Pro další vyšetření korelace demonstrované v příkladu 16 byla určena požadovaná koncentrace protilátek pro inhibici downregulaci.

Metody: Klony Th buněk KMHA25 a DSHABB10 (viz tabulka 3) byly inkubovány s mitomycinem C ošetřenými Priess buňkami jako APC, HA307-319 peptidem jako antigenem a ukázanými koncentracemi mAb LB3.1. Antigen specifická proliferace Th buněk (horní panel) byla měřena inkorporací <sup>3</sup>H-thymidinu o tři dny později. Průtoková cytometrie Priess buněk s mAb LB3.1 (dolní panel) byla provedena jako v příkladu 3. Výsledky jsou ukázány na obrázku 14.

Závěr: Téměř kompletní inhibice Th odpovědi byla dosažena s koncentrací mAb, která indukovala 90% downregulaci DR v asi 2/3 APC (bez jejich usmrcení), což napovídá, že pro oba fenomény je zapotřebí asi stejná koncentrace.

### Příklad 18

Účinek anti DR mAb a Fab fragmentů na antigenní presentaci fixovanými APC

Bylo zkoumáno, zda DR downregulace je jediný mechanismus využitý v inhibici odpovědi Th buněk.

Metody: APC (LG-2) byly fixovány glutaraldehydem (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). Odpověď klonu Th buněk NBHAC25 na mitomycinem ošetřené ("My") nebo fixované ("Fix") LG-2 plus HA307-319 (134 nM) v přítomnosti mAb nebo Fab byla měřena jako v příkladu 17. Výsledky jsou ukázány na obrázku 15.

Závěr: Anti-třída II mAb a jejich Fab fragmenty mohou také inhibovat odpověď Th buněk na peptidový antigen presentovaný fixovanými (t.j. usmrcenými) APC, kde downregulace třídy II molekul není možná. Tak alespoň jeden další mechanismus, nejpravděpodobněji sterická překážka interakce třída II - antigenní receptor Th buněk (TCR) hraje roli v inhibici Th buněk.

#### Příklad 19

Účinek antigenu zavedeného na silné mAb, Fab a peptidové antagonisty.

Relativní účinnost anti-třída II mAb, jejich fragmentů a antagonistů vazebného místa pro peptid v inhibici odpovědi Th buněk byla srovnávána.

Metody: Jako v příkladu 15. Th klon NBHAC25; APC LG-2. Horní panel HA 307-319 13,4 nM, dolní panel 330 nM. Peptidy jako v tabulce 3. Výsledky jsou ukázány na obrázku 16.

Závěr: Protilátky a Fab fragmenty mají srovnatelnou inhibiční kapacitu, s tím, že druhé jmenované jsou pouze o něco méně účinné než prvně. Oboje jsou, nicméně,

několiksetkrát účinnější než peptidy. Je významné zaznamenat, že zvýšení koncentrace antigenu (30 krát vyšší než v horním panelu obrázku 16) učinilo peptidové antagonisty méně účinnými, ale neovlivnilo potenciál mAb. Toto pozorování je vysvětlitelné odlišným mechanismem inhibice: zatímco peptidy přímo soutěží s antigenem o vazebná místa třídy II, protilátky downregulují expresi třídy II stejně jako brání MHC-TCR interakci.

#### Příklad 20

Relativní účinky Fab a peptidu na křivky dávka antigenu - odpověď

Schopnost Fab fragmentů a peptidů inhibovat odpověď Th buněk byla srovnávána pro široký rozsah koncentrací antigenu.

Metody: Jako v příkladu 17. Th klon NBHAC25; APC LG-2. HA 307-319 od 13,4 pM do 134 nM; Fab 100 nM; peptid aXA,, 100 μM. Výsledky jsou ukázány na obrázku 17.

Závěr: Z dat je jasné, že Fab fragmenty mají schopnost inhibovat odpověď Th buněk při asi 1000 krát vyšší koncentraci antigenu než peptidy, a tento rozdíl zůstává konstantní v celém rozsahu koncentrací antigenu.

#### Příklad 21

Účinek antagonistů třídy II na nástup odpovědi Th buněk

Bylo důležité stanovit, zda různé druhy antagonistů třídy II mohou interferovat s nástupem odpovědi Th buněk. Ačkoliv tato otázka nemůže být důkladně zkoumána uvnitř krátkého časového období in vitro odpovědi Th buněk, byl proveden pokus o srovnání mezi Fab fragmenty a peptidy přidanými v různou dobu k systému APC-antigen-Th buňka.

Metody: Jako v příkladu 17. Th klon NBHAC25; APC LG-2. HA 307-319 4 nM. Inkubace APC s HA od -2 hodin. Klony přidány v hodinu 0. Byly použity Fab LB3.1. Výsledky jsou ukázány na obrázku 18.

Závěr: Oddálené přidání antagonisty peptidu vedlo ke graduálnímu, časové dependentnímu narušení inhibiční aktivity, která nemohla být obnovena zvýšením koncentrace kompetitoru. Oproti tomu, Fab fragmenty způsobily téměř kompletní inhibici, pokud byly přidány 2 hodiny po Th buňkách, a snížený inhibiční potenciál při oddáleném podání mohl být kompenzován zvýšenou koncentrací Fab. Tak se Fab fragmenty zdají být účinnějšími v interferenci s nástupem odpovědi Th buněk, než momentálně dostupné peptidové kompetitory.

## Příklad 22

### Produkce mAb 1-1C4

HLA-DR byl imunoprecipitován z EBV-LCL Priess za použití mAb L243 a HLA-DR  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce byly separovány SDS-PAGE. 28k elektroforetický proužek obsahující DR- $\beta$  byl vystřižen z gelu a použit pro imunizaci BALB/c myši. Myši imunitní B buňky byly

následně imortalizovány fuzí s myelomovou linií PAI-0 (Stocker, W et al., Research Disclosure, 217, 155 - 157 (1982)) tak, aby vznikly mAb secernující hybridomy. Supernatanty kultury takových hybridomů byly vyšetřovány na svou schopnost inhibovat aktivaci HA/DRB1\*0401 Th buněk klonu KMHA25 (viz tabulka 3) v přítomnosti antigenu HA 307 - 319 a Priess jako APC. Hybridom 1-1C4 byl identifikován jako secernující mAb mající inhibiční kapacitu.

## Odkazy:

1. Babbitt, B. et al. *Nature*, 317, 359-361 (1985).
2. Baxevanis, C.N. et al. *Immunogenetics* 11, 617-625 (1980).
3. Rosenbaum, J.T. et al. *J. Exp. Med.*, 154, 1694-1702 (1981).
4. Waldor, M.K. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2713-2717 (1983).
5. Jonker, M. et al. *J. Autoimmun.*, 1, 399-414 (1988).
6. Stevens, H.P. et al. *Transplant. Proc.*, 22, 1783-1784 (1990).
7. Billing, R. & Chatterjee, S. *Transplant. Proc.* 15, 649-650 (1983).
8. Jonker, M. et al. *Transplant. Proc.*, 23, 264-265 (1991).
9. Gorga, J.C. et al. *Cell. Immunol.*, 103, 160-173 (1986).
10. Woods, A. et al. *J. Exp. Med.*, 180, 173-181 (1994).
11. Lampson, L.A. & Levy, R. *J. Immunol.* 125, 293-299 (1980).
12. DeJelo, C.L. et al. *Humman Immunol.*, 17, 135-136 (1986).
13. Radka, S.F. et al. *J. Immunol.*, 130, 1863-1866 (1983).
14. Cammarota, G. et al. *Nature*, 356, 799-801 (1992).
15. Nabavi, N. et al. *Nature*, 360, 266-268 (1992).
16. Pennell, C.A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3799-3803 (1985).
17. Ishioka, G. Y. et al. *J. Immunol.*, 152, 4310-4319 (1993).
18. Andrew, S.M. & Titus, J.A. *Current Protocols in Immunology* (eds. Coligan, J.E. et al.) 1, 2.8.1-2.8.10 (Greene & Wiley, New York, 1994)
19. Palacios, R. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 82, 6652-6656 (1985).
20. Altomonte, M. et al. *J. Immunol.*, 151, 5115-5122 (1993).
21. Palacios, R. et al. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 80, 3456-3460 (1983).
22. Clement, L.T. et al. *J. Immunol.*, 136, 2375-2381 (1986).
23. Howard, D.R. et al. *Exp. Hematol.*, 14, 887-895 (1986).
24. Vaickus, L. et al. *Cell. Immunol.*, 119, 445-458 (1989).
25. Kabelitz, D. & Janssen, O. *Cell. Immunol.*, 120, 21-30 (1989).
26. Holte, H. et al. *Eur. J. Immunol.* 19, 1221-1225 (1989).
27. Newell, M.K. et al. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10459-10463 (1993).
28. Truman, J.-P. et al. *Int. Immunol.*, 6, 887-896 (1994).
29. Mourad, W. et al. *J. Exp. Med.*, 172, 1513-1516 (1990).
30. Naquet, P. et al. *Immunogenetics.*, 18, 559-574 (1983).

31. Gilfillan, S. et al. *J. Immunol.*, 147, 4074-4081 (1991).
32. Panina-Bordignon, P. et al. *Eur. J. Immunol.*, 19, 2237-2242 (1989).
33. Harris, E.D. Jr. *N. Engl. J. Med.*, 322(18):1277 (1990).
34. Cosimi, B. et al. *N. Engl. J. Med.*, 305, 308-314 (1981).
35. Chatenoud, L. et al. *Eur. J. Immunol.*, 12, 979-982 (1982).
36. Svejgaard, A. et al. *Immunol. Rev.*, 70, 193-218 (1983).
37. Todd, J.A. et al. *Science*, 240 1003-1009 (1988).
38. Nepom, G.T. et al. *Immunol.*, 9, 493-525 (1991).
39. Sprent, J. et al. *J. Exp. Med.* 163, 998-1011 (1986).
40. Santos, G.W. *Immunol. Rev.* 88, 169-192 (1985).
41. Lehmann, P.V. et al. *J. Exp. Med.*, 171, 1485-1496 (1990).
42. Co, M.S. and Queen, C. *Nature*, 351, 501-502 (1991).
43. Lewis, A.P. and Crowe, J.S. *Gene*, 101, 297-302 (1991).

H

## P a t e n t o v é   n á r o k y

1. Fab fragment obsahující imunoglobulinový Fab fragment a šest komplementaritu určujících regionů, které jsou obsaženy v uvedeném Fab fragmentu, kde jeden až šest z uvedených komplementaritu určujících regionů jsou komplementaritu určující regiony monoklonální protilátky mající následující vlastnosti:

1) monoklonální protilátka se váže na první doménu HLA-DR,

2) monoklonální protilátka je cytotoxická pro antigen prezentující buňky, které exprivují HLA-DR,

3) monoklonální protilátka snižuje expresi HLA-DR na antigen prezentujících buňkách.

2. Fab fragment podle nároku 1, kde monoklonální protilátka je myší monoklonální protilátka.

3. Fab fragment podle nároku 2, kde imunoglobulin je lidský imunoglobulin.

4. Fab fragment podle nároku 3, kde šest komplementaritu určujících regionů uvedeného Fab fragmentu je šest komplementaritu určujících regionů uvedené monoklonální

protilátky.

5. Kapalná farmaceutická kompozice obsahující:

- 1) farmaceuticky přijatelný kapalný nosič; a
- 2) terapeuticky účinné množství Fab fragmentu podle jakéhokoliv z nároků 2 až 4.

6. Kompozice podle nároku 5, kde množství Fab fragmentu je od 0,5 do 5 mg/ml kapalné kompozice.

7. Kompozice podle nároku 6, kde množství Fab fragmentu je od 1 do 2 mg/ml kapalné kompozice.

8. Způsob přípravy Fab fragmentu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že monoklonální protilátka jak je definována v nárocích 1 nebo 2 je štěpena pepsinem a Fab fragmenty jsou izolovány metodami v oboru známými.

9. Fab fragment připravený způsobem podle nároku 8.

10. Fab fragment podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 jako terapeuticky aktivní agens, zejména jako imunosupresivní agens.

11. Použití Fab fragmentu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 pro supresi imunitní odpovědi u pacienta.

12. Použití Fab fragmentu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 pro léčbu revmatoidní artritidy.

13. Vynález jak je zde popsán.

14. Způsob pro supresi imunitní odpovědi u pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání terapeuticky účinného množství Fab fragmentu obsahujícího Fab fragment jak je definován v nárocích 3 nebo 4.

16

Obrázek 1/1

FITC barvení

vith

16 hodin kokultivace s

54  $\mu$ M aXA

20 nM LB3.1

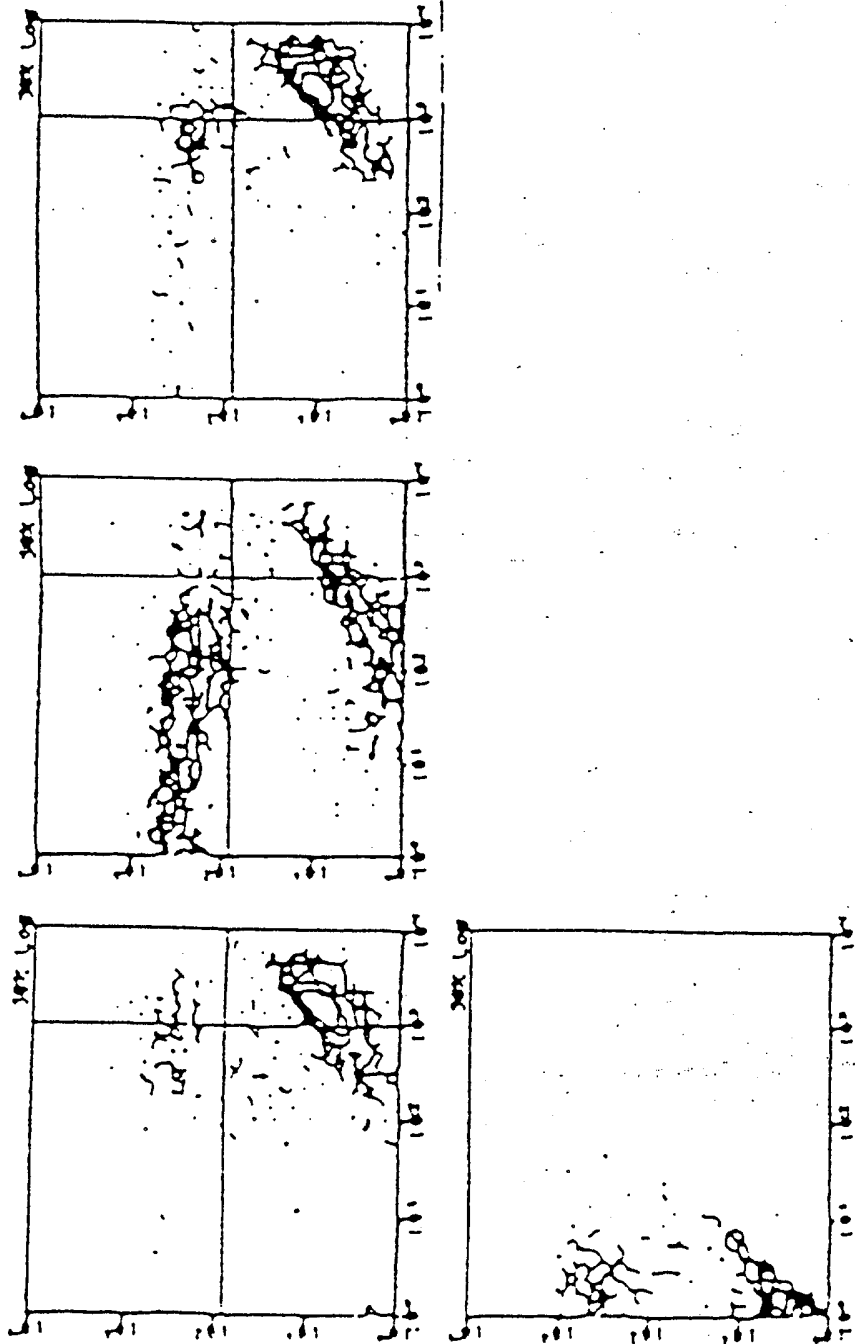
0

01/22

HLA-DR

pozadí

a



1424-97

50

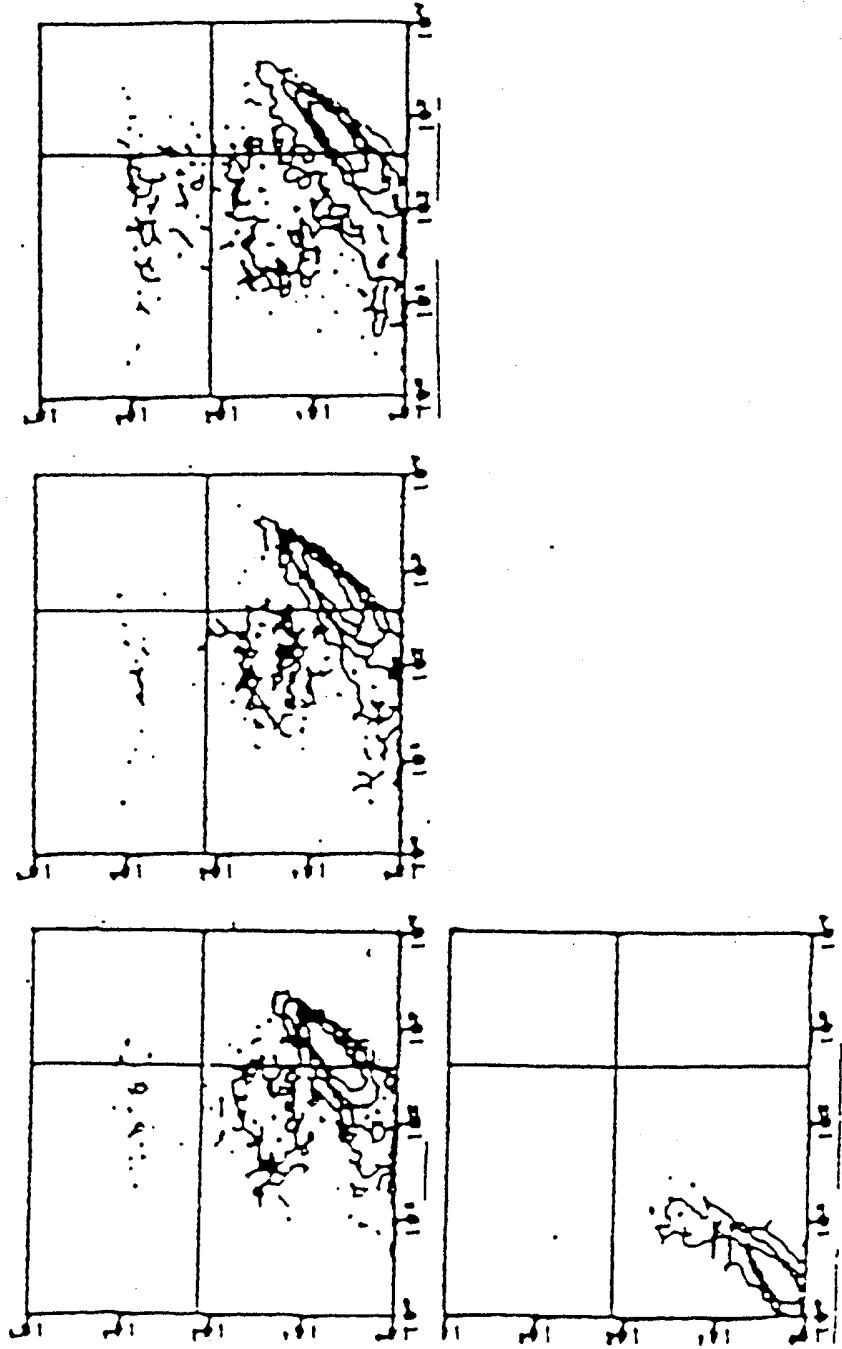
Obrázek 1/2

FITC barvení

16 hodin kokultivace s

*b*

0 200 nM CCCL20 20 nM CCCL20



02/22

HLA-DR

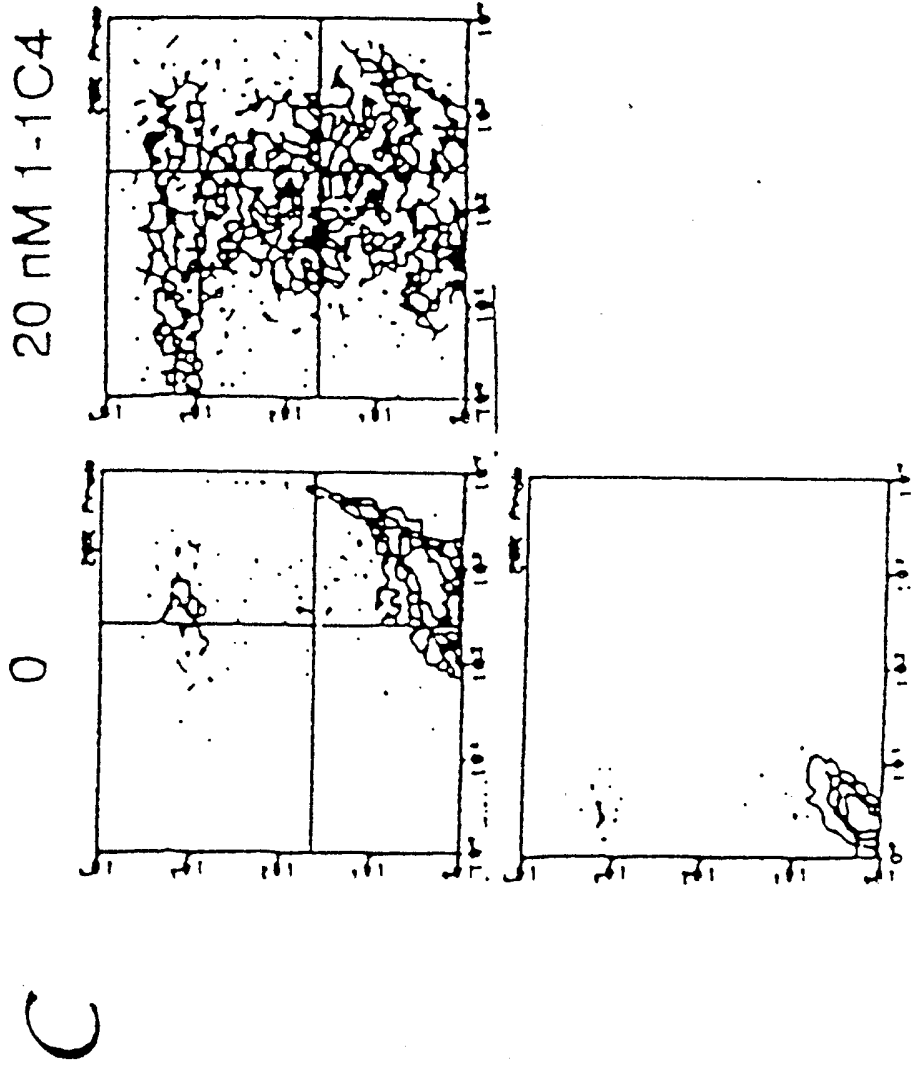
pozadí

1724-94

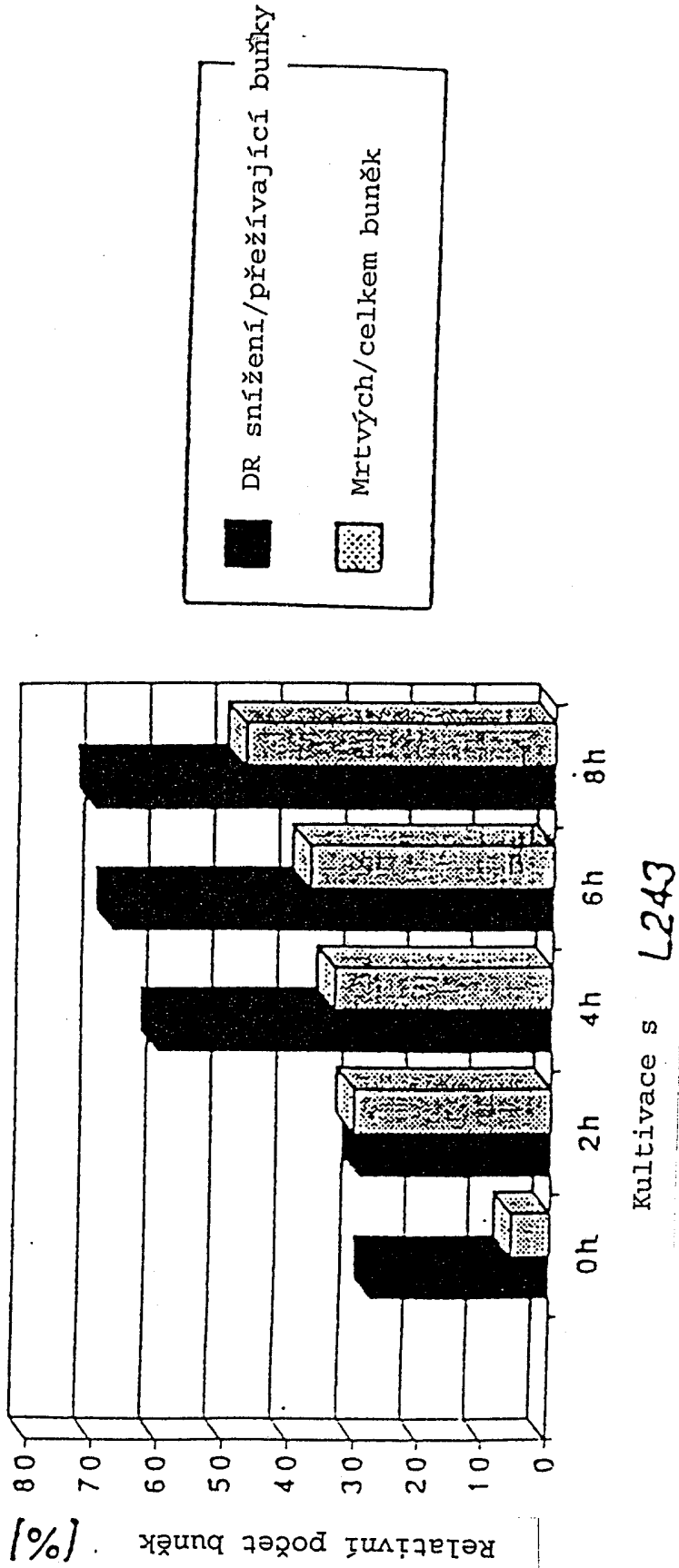
Obrázek 1/3

16 hodin kokultivace s

FITC barvení



Obrázek 2

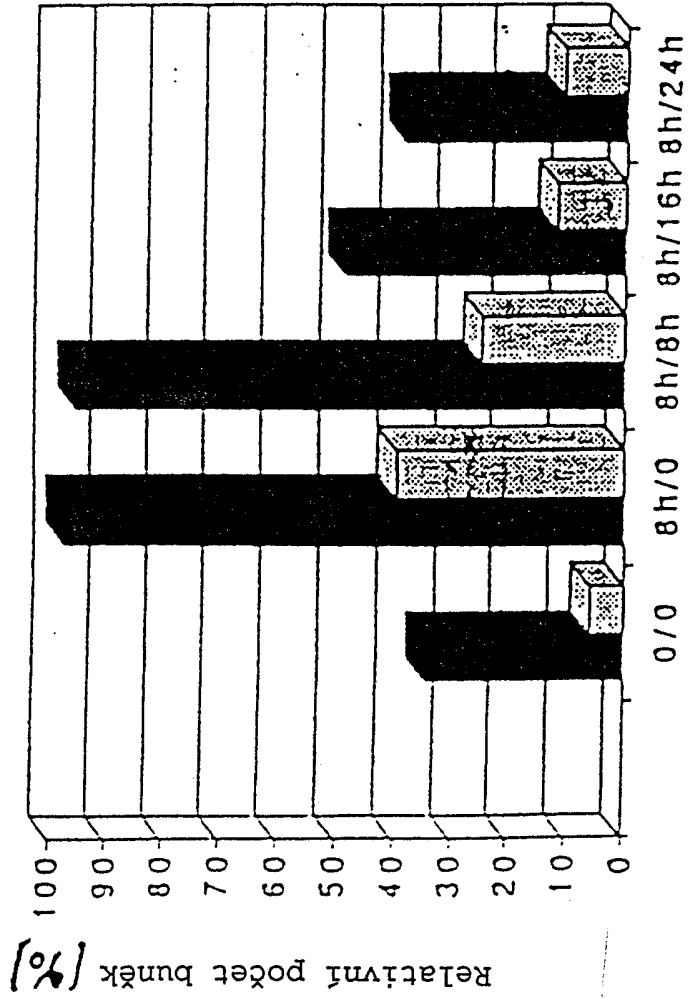


1724-97

I 100000443

05 / 22

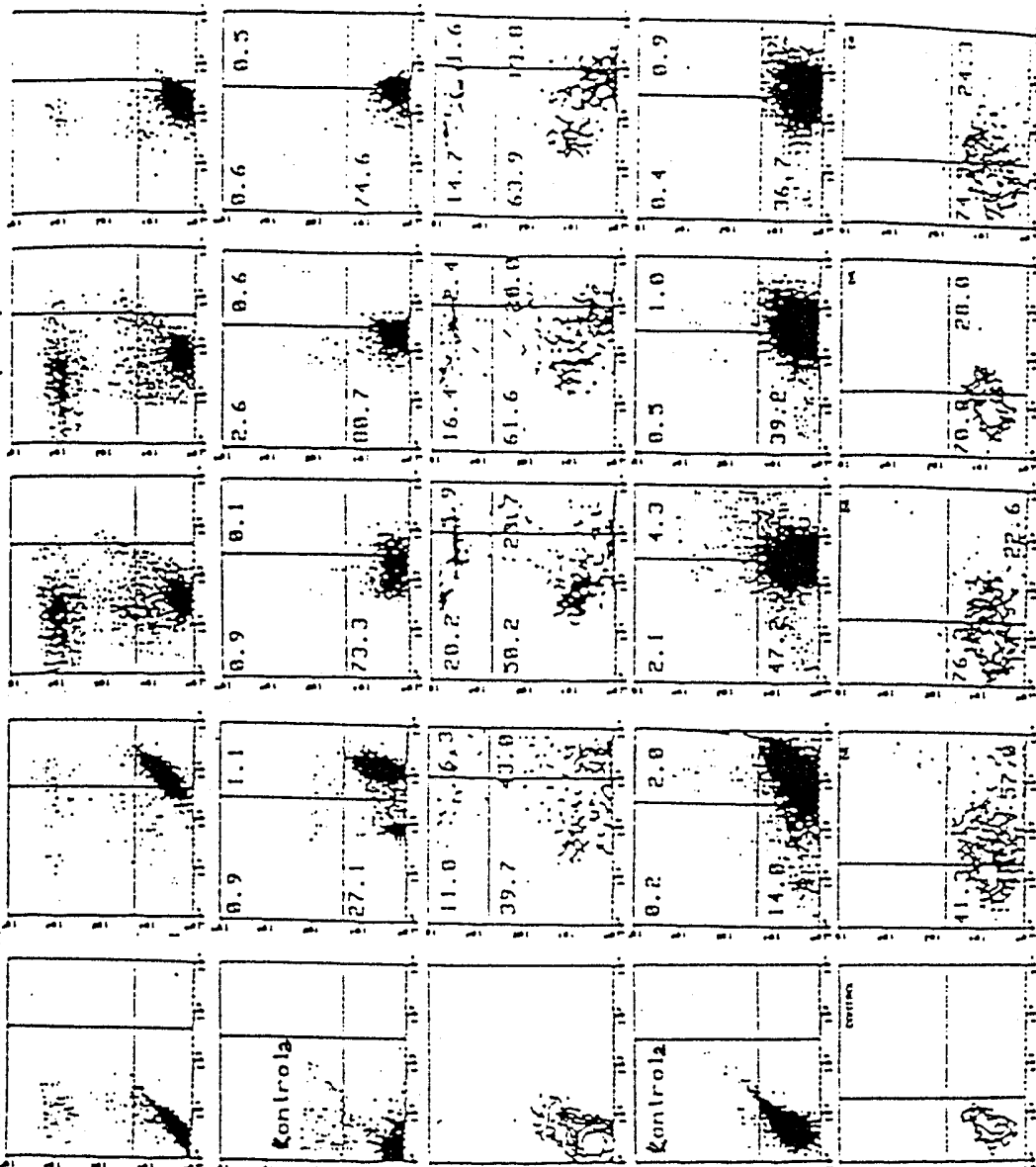
Obrázek 3



čas s/bez L243

Obrázek 4

Pozadí DR-FITC 16 hodin kultivace s L243  
 FITC barvení barvení Kompletní Ab F(nb)2 Fnb  
 Buňky EBV-LCL Prloss



Obrázek 5

# Priess

16 hodin kultivace s L243

DR-FITC

pozadí FITC barvení

barvení

kompletní Ab

Fab

Fab

Fab

20nM

3.0

4.6

200nM

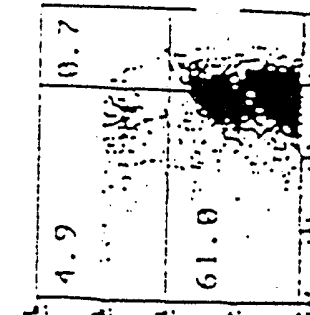
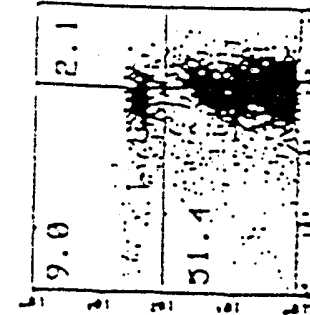
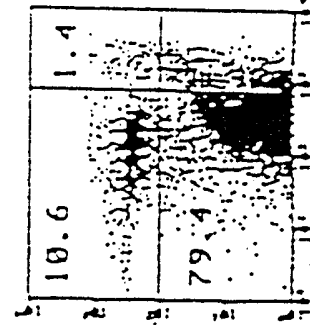
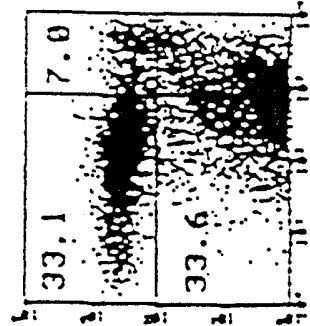
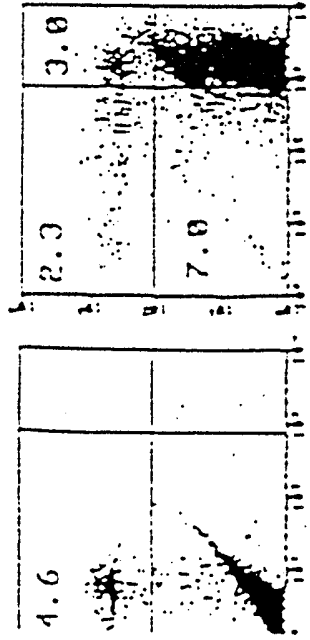
60nM

20nM

7.0

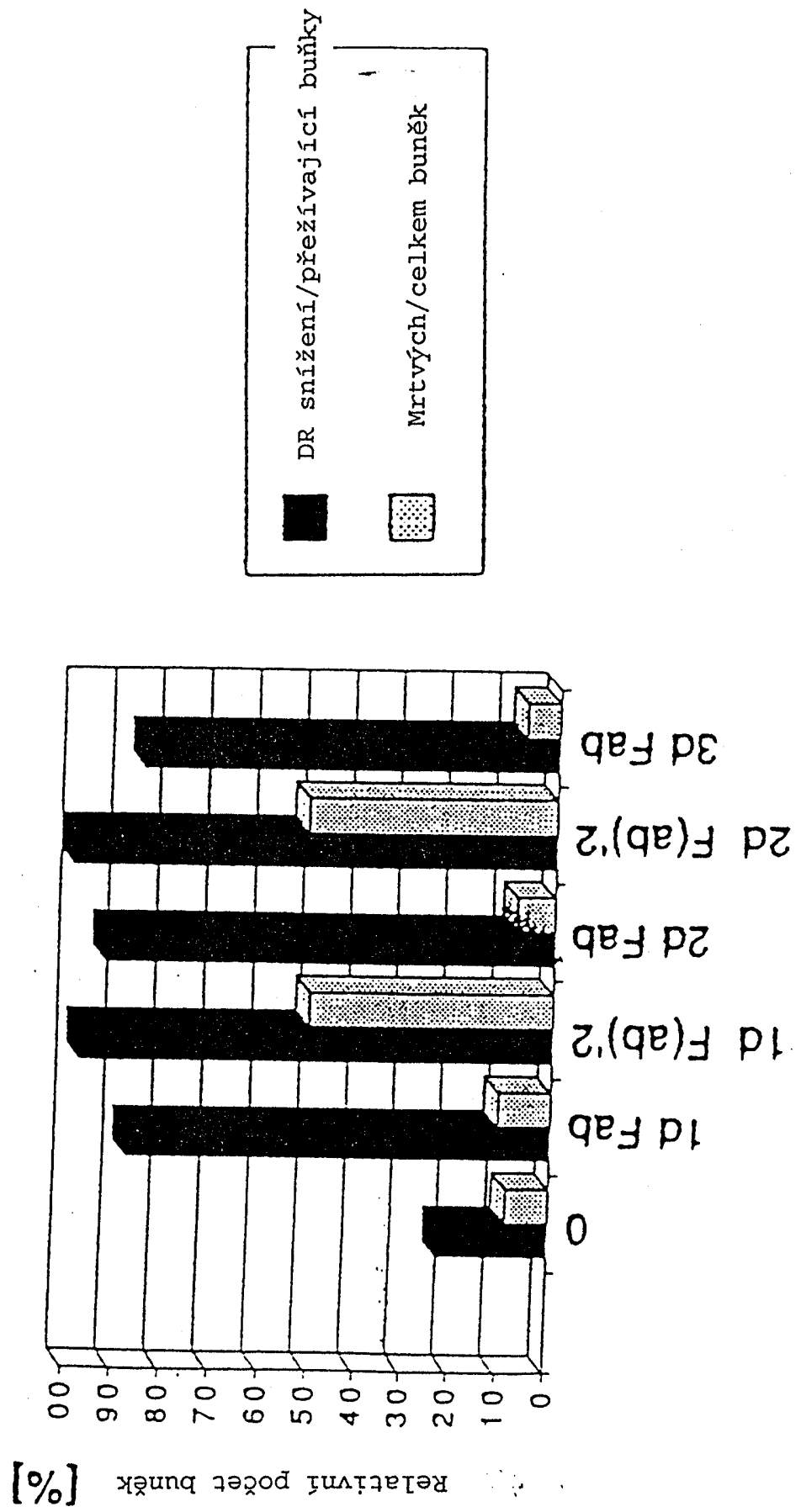
2.3

4.6



0 8 / 2 2

Obrázek 6



Obrázek 7

EBV-LCL PRIESS

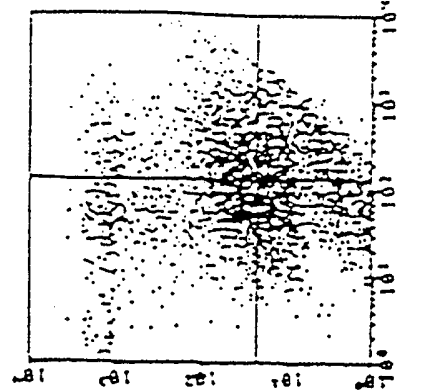
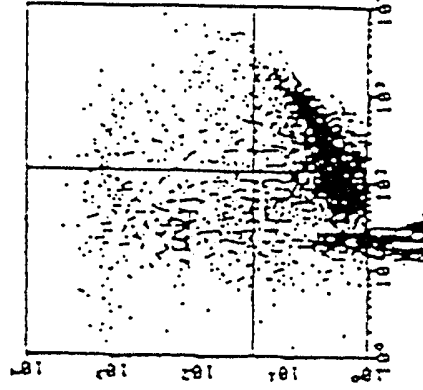
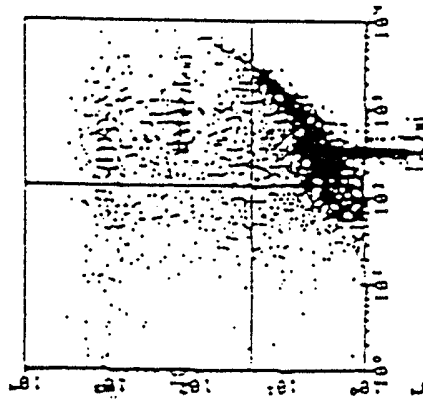
16 h kokultivace s L243

FITC barvení

Ne Ab

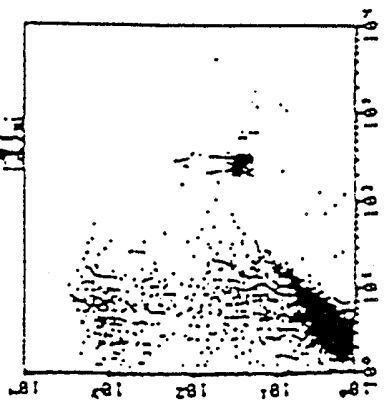
Fab

Fab + anti-Ig



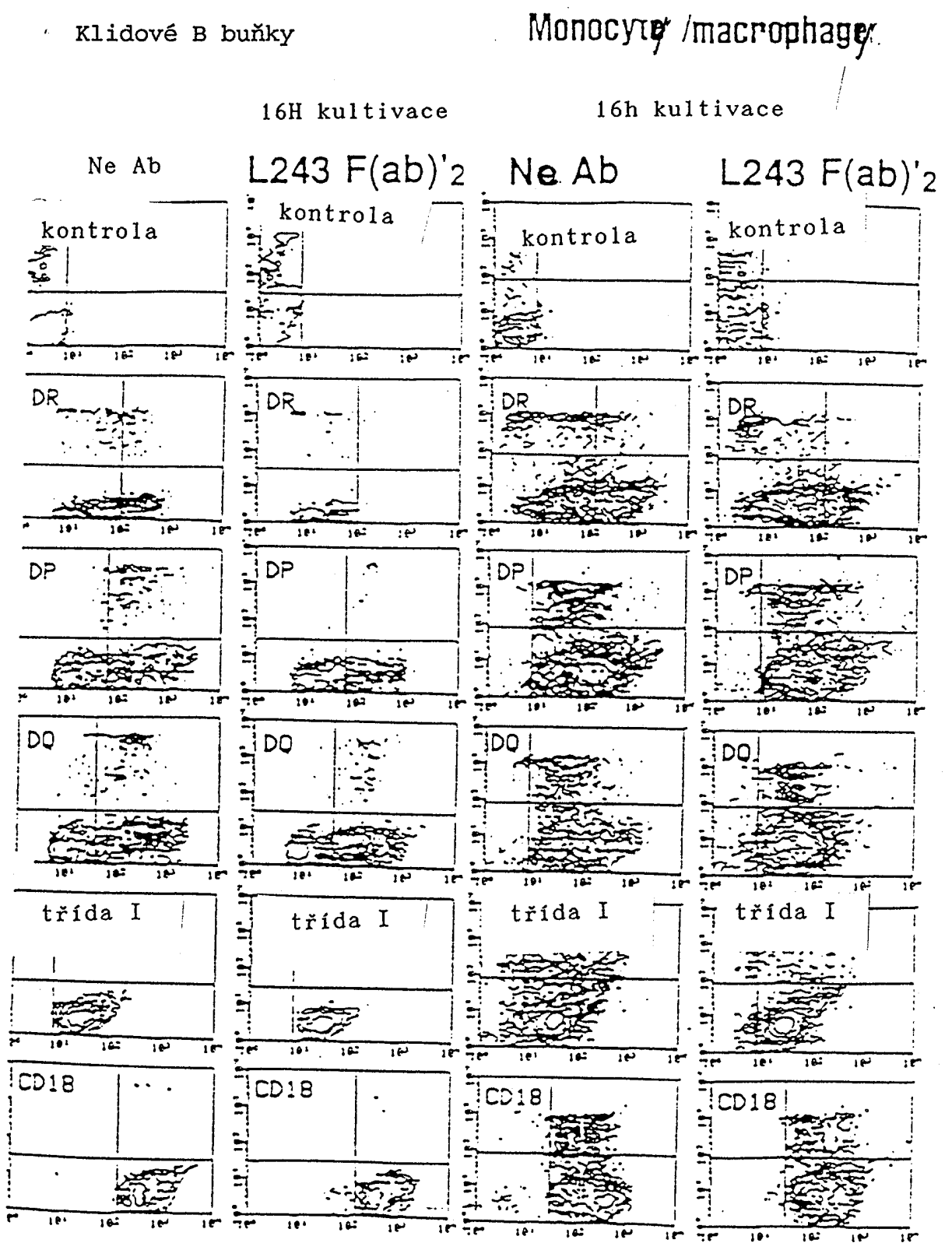
HLA-DR

Pozadí



10/22

Obrázek 8

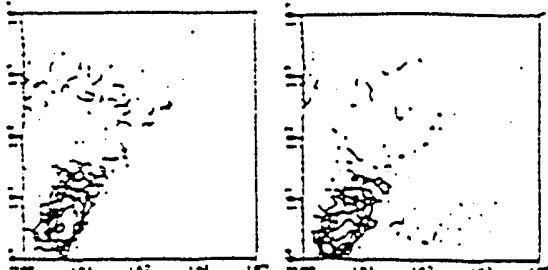


16 kulturae

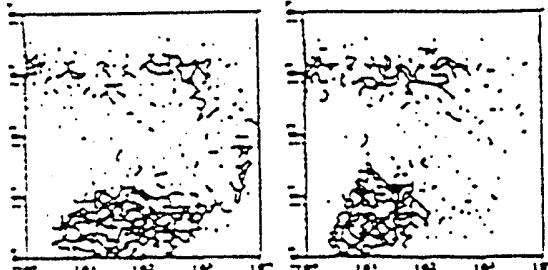
Ne Ab

L243 F(ab)'<sub>2</sub>

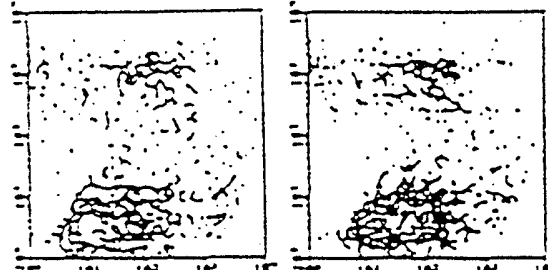
Pozadí  
FITC barvení



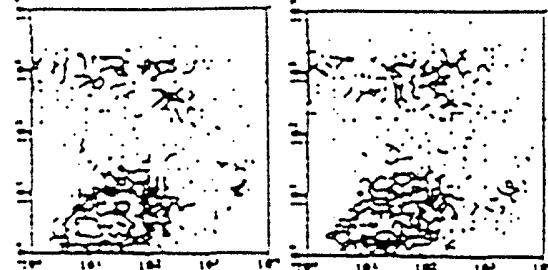
DR-FITC  
barvení



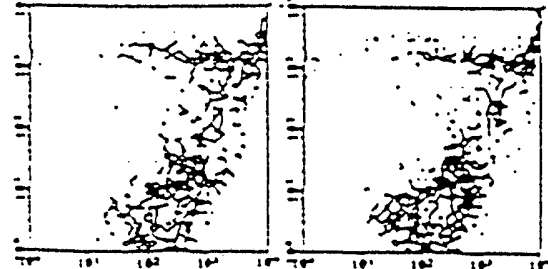
DP-FITC  
barvení



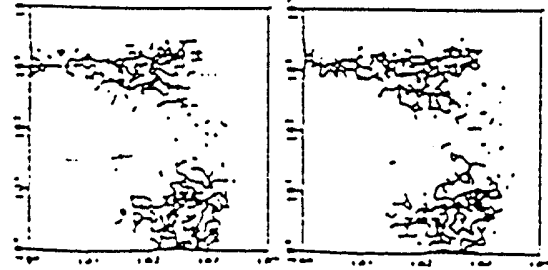
DQ-FITC  
barvení



Class I-FITC  
barvení



CD18-FITC  
barvení



12/22

Obrázek 10

EBV-LCL LG2

16h kultivace s L243

Ne Ab

F(ab)'2

Fab

pozadí  
FITC zbarvení

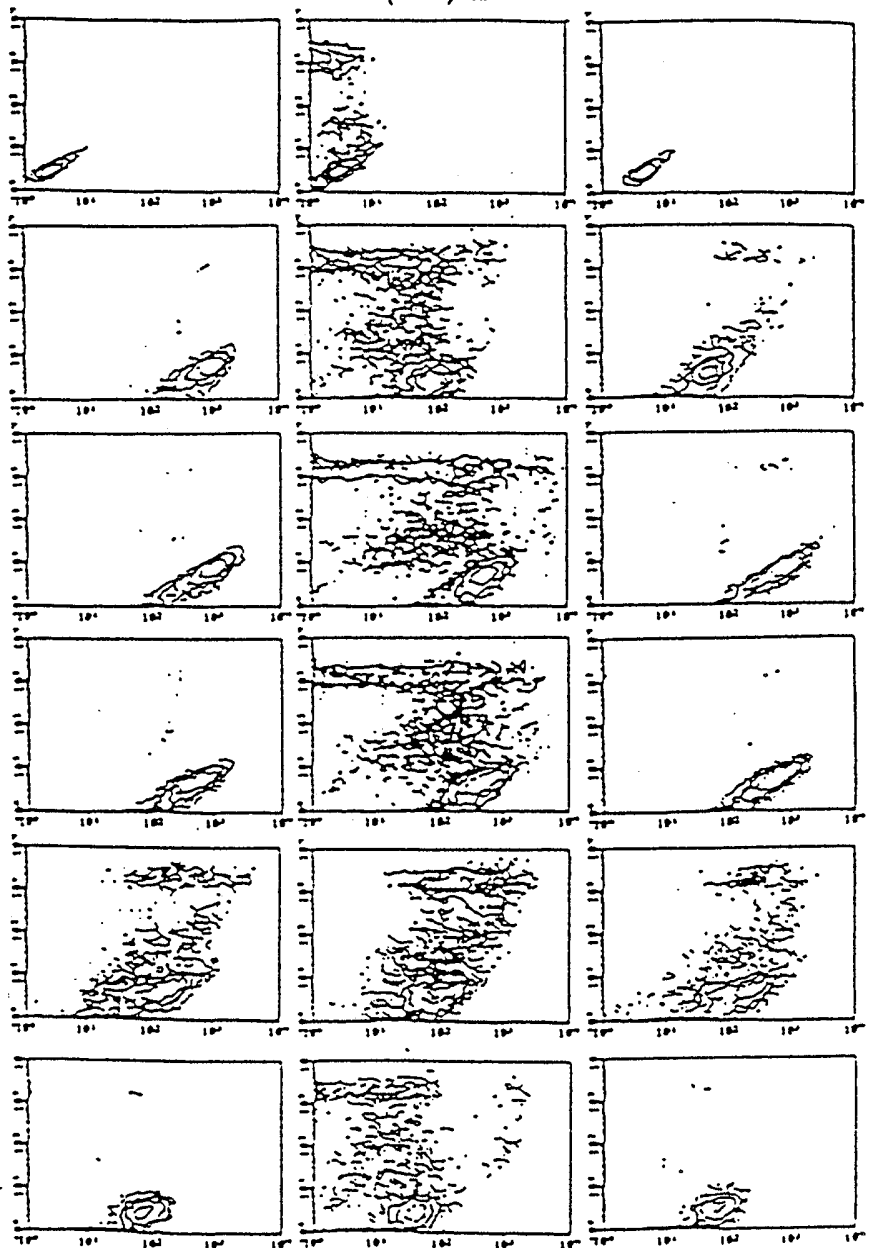
DR-FITC  
zabarvení

DP-FITC  
zabarvení

DQ-FITC  
zabarvení

Třída I-FITC  
zabarvení

CD18-FITC  
zabarvení



13/22

Obrázek 11

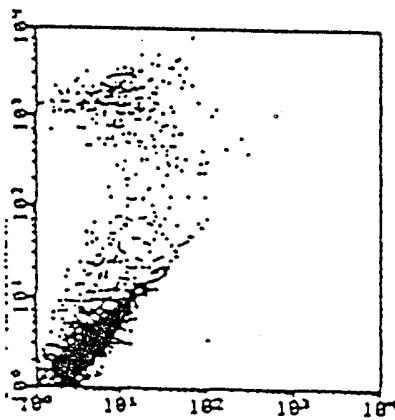
B buňky ~~DRB1\*0101/DRB1\*1101X~~ předkultivované s mAB

FITC zabarvení

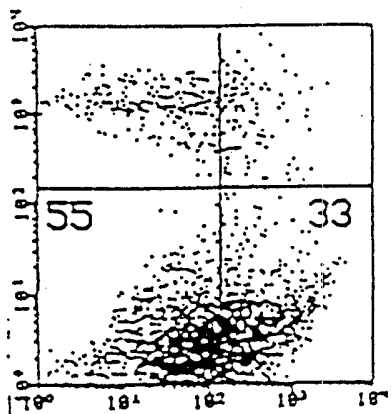
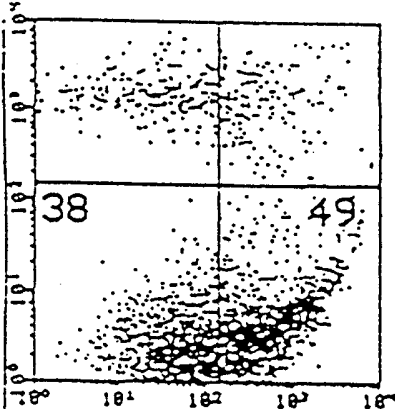
žádné

Anti-DRB1\*110X

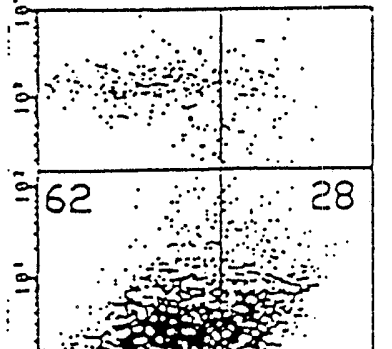
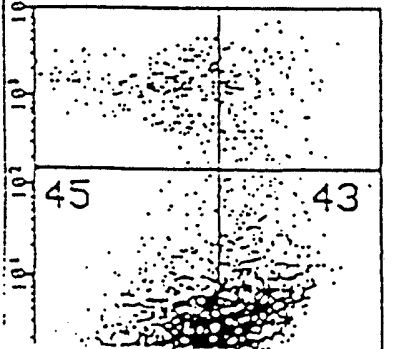
pozadí



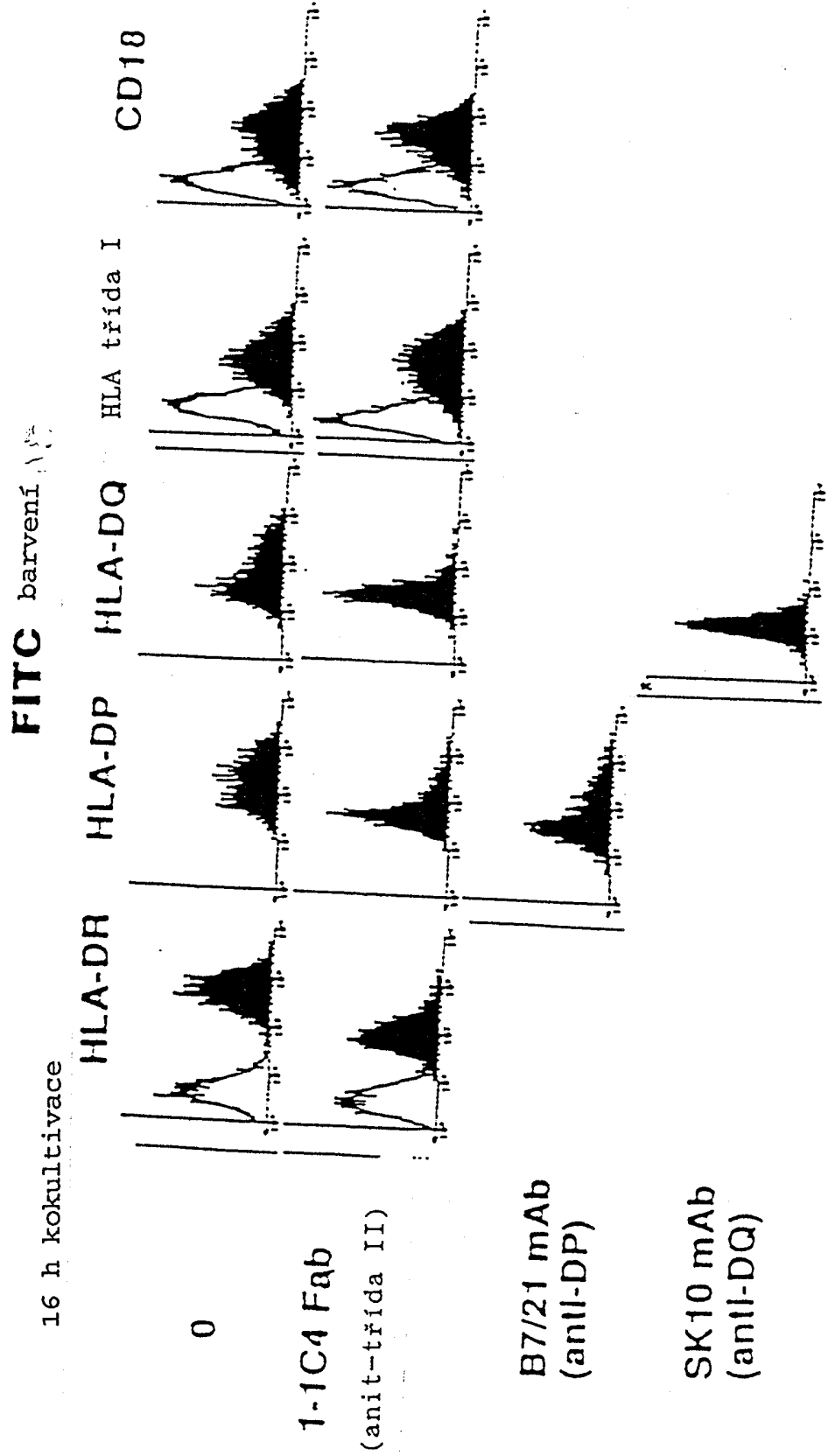
DRB1\*110X



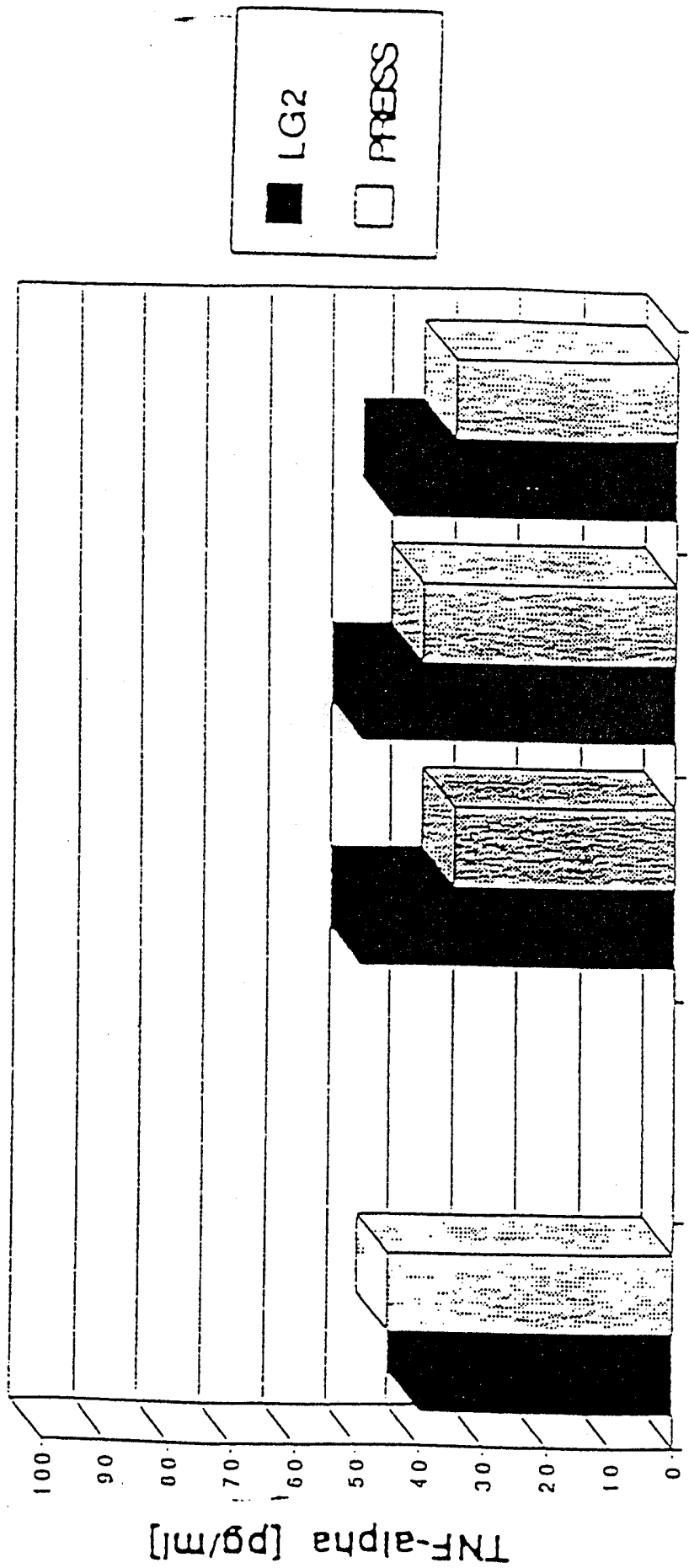
DRB1\*0101



Obrázek 12



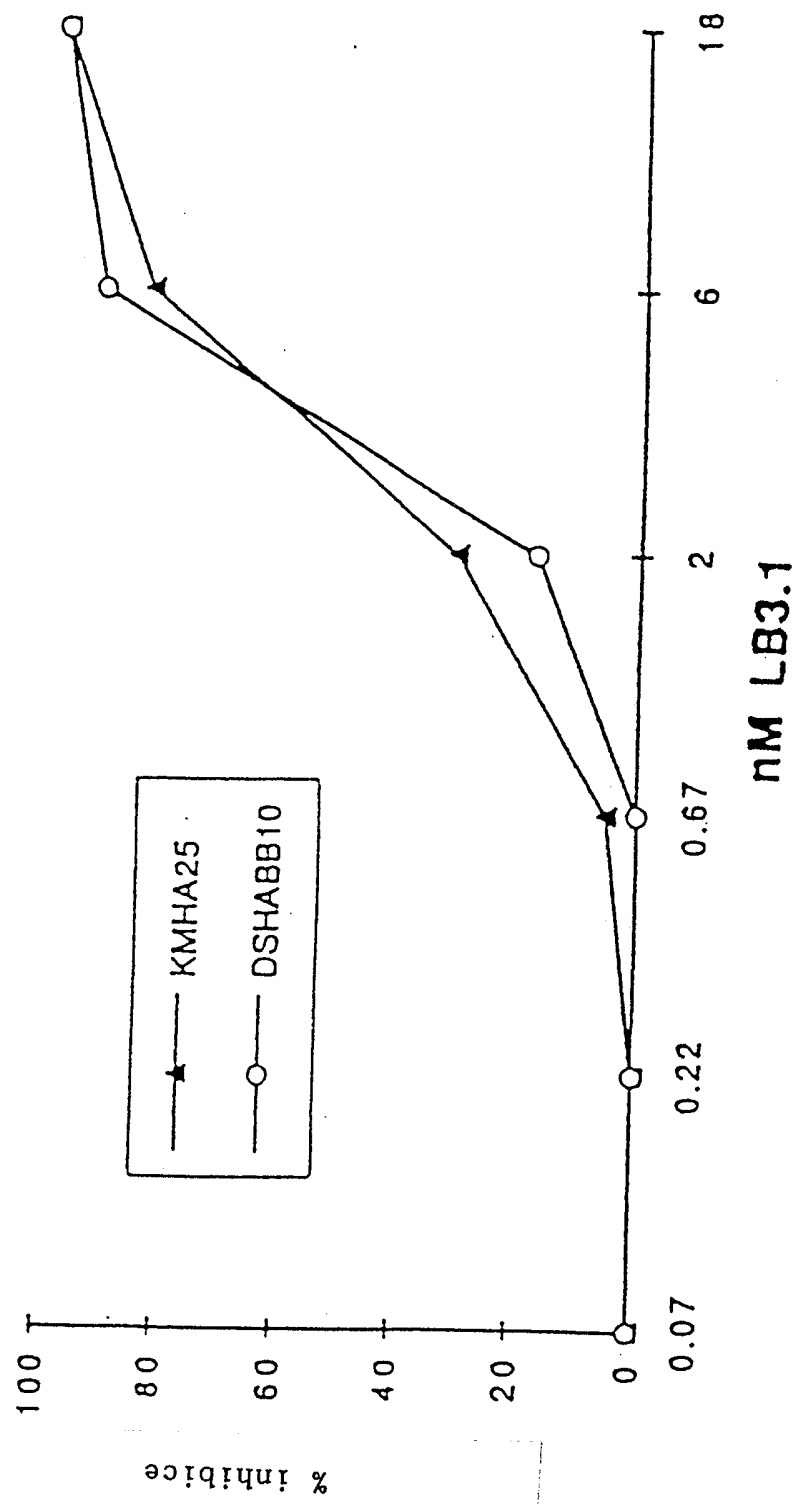
Obrázek 13



L243/Kompl. L243/F(ab)'2 L243/Fab

16/22

Obrázek 14/1



Obrázek 14/2

16 h kokultivace LB3.1

FITC barvení

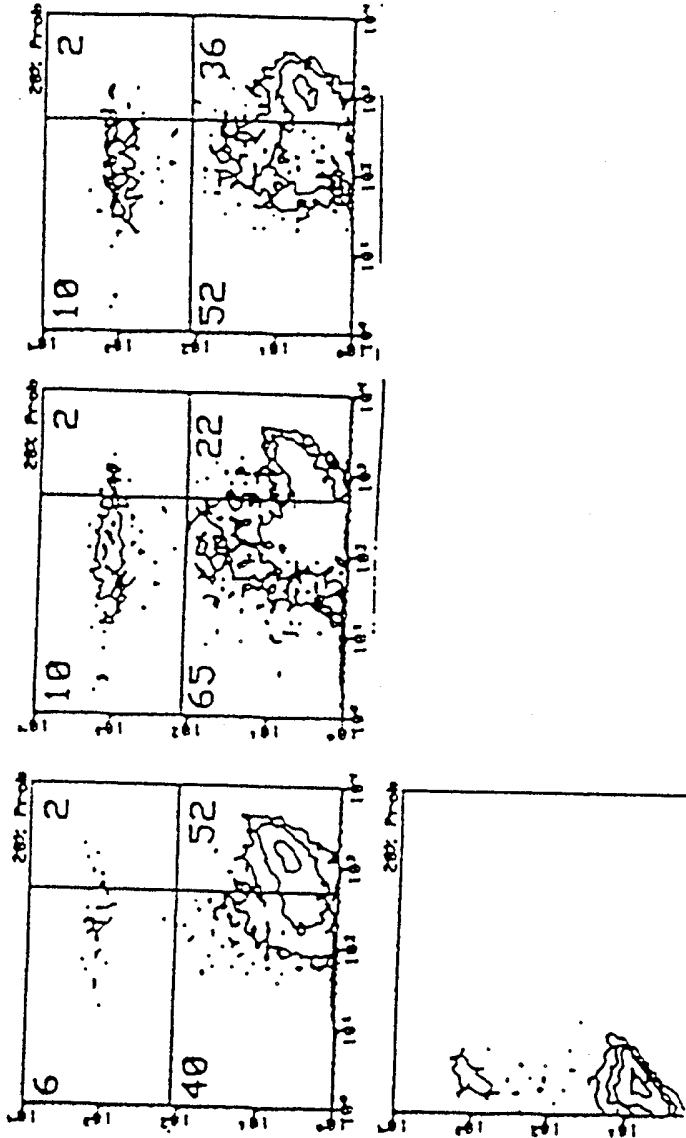
žádná

HLA-DR

Pozadí

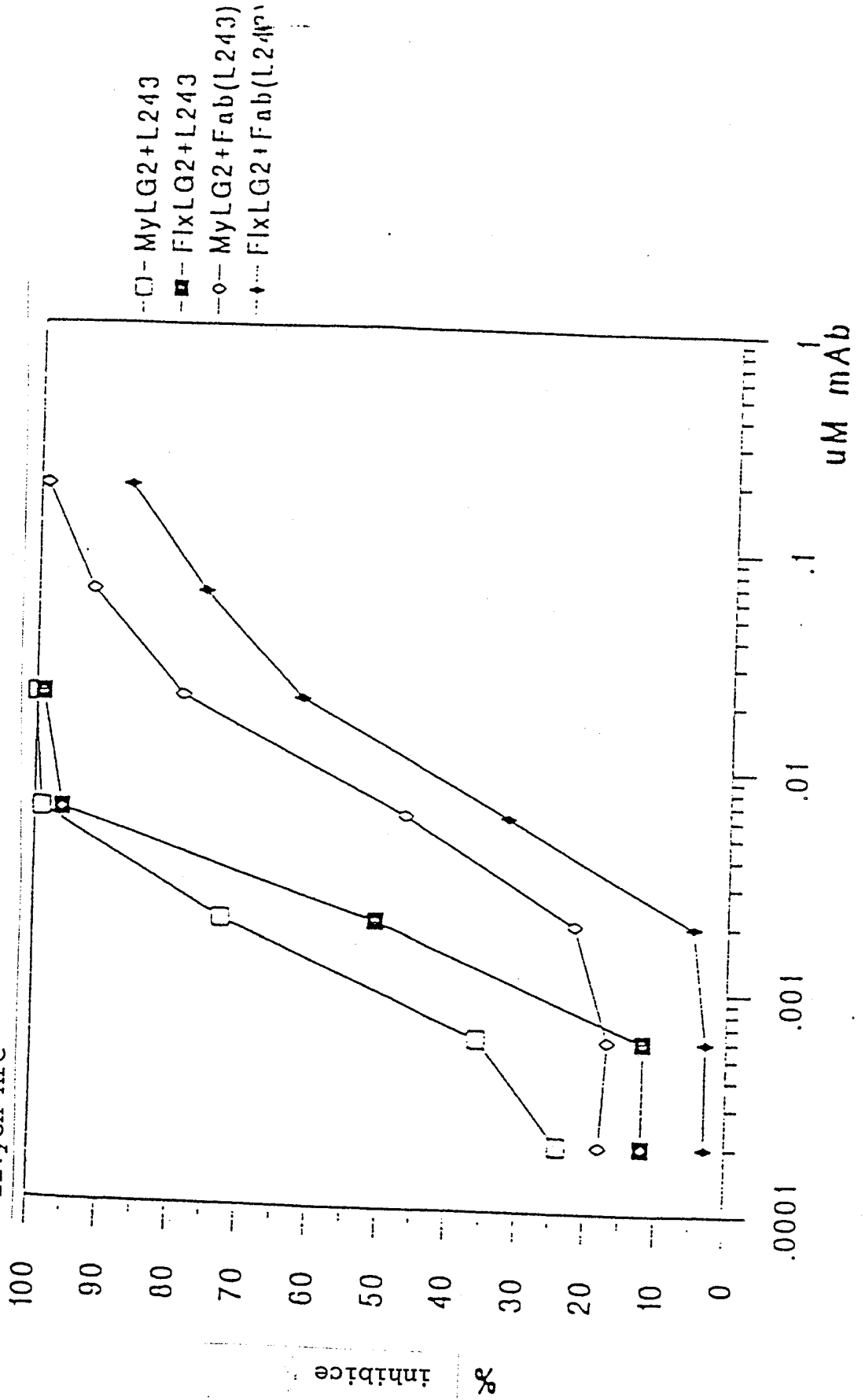
2 nM

6 nM



Obrázek 15

mAb blokující odpověď T buněk za použití fixovaných versus živých APC

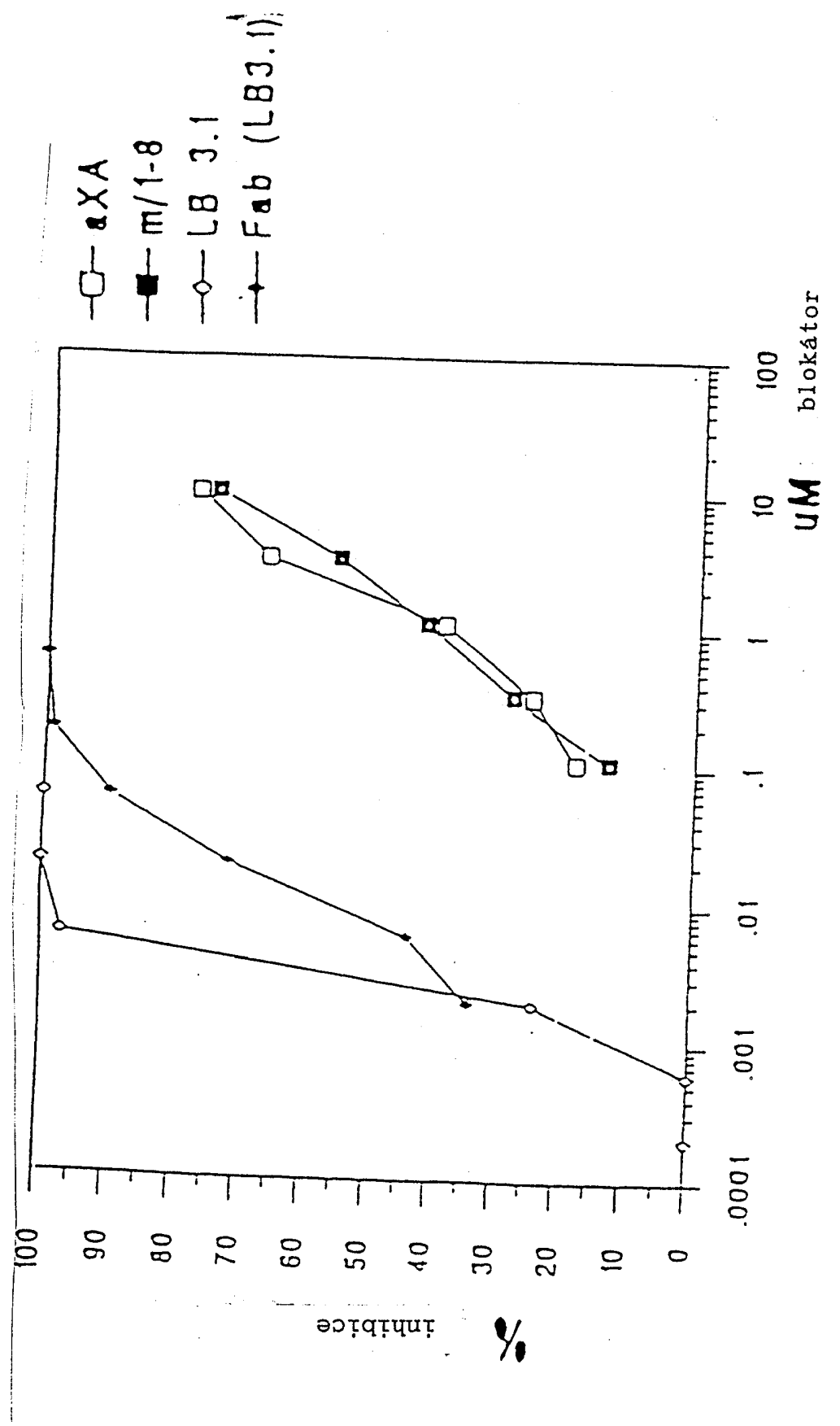


1724-97

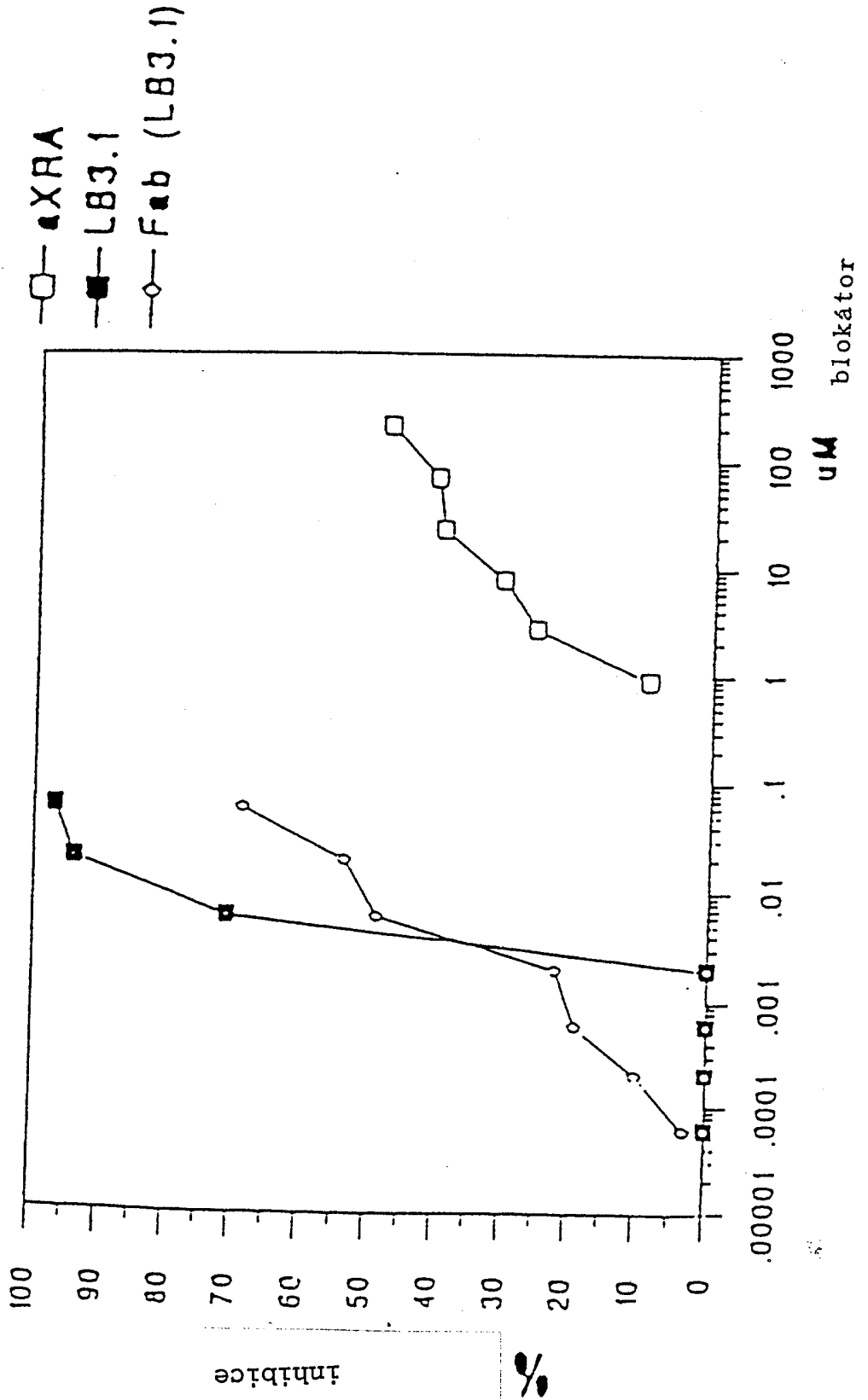
19/22

Obrázek 16/1

Inhibice T buněčné odpovědi: Vliv antigenového zatížení



Obrázek 16/2

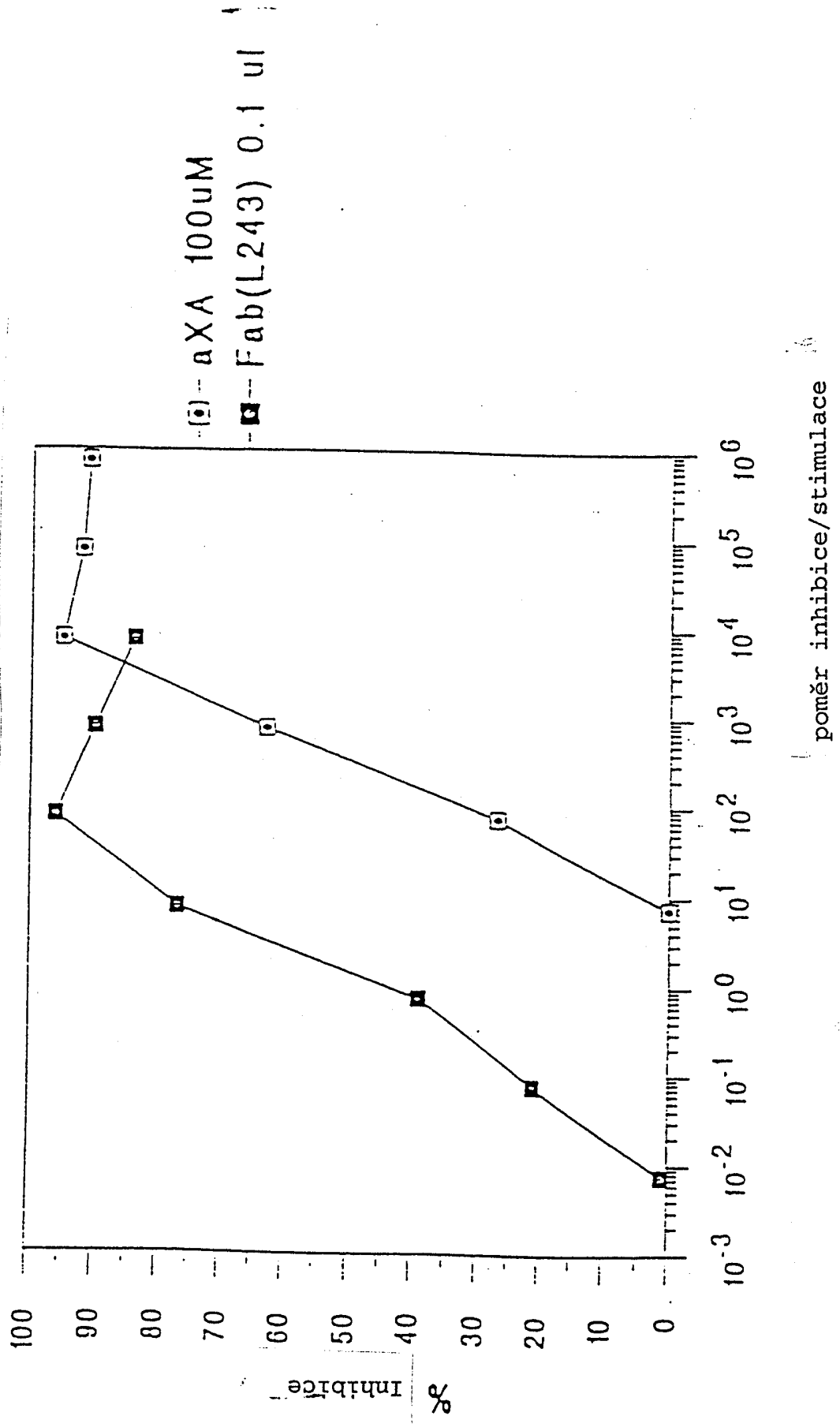


1724-97

21/22

Obrázek 17

Srovnání peptidových antagonistů a Fab (L243) v inhibiční odpovědi T buněk



Obrázek 18

účinek třídy II antagonistů na nástup odpovědi T buněk

