

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**437-98**

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16. 08. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.08.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9516760**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**  
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/03616**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/07218**

(13) Druh dokumentu: **A3**

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

|               |               |
|---------------|---------------|
| <b>C 12 N</b> | <b>15/62</b>  |
| <b>C 07 K</b> | <b>16/28</b>  |
| <b>C 07 K</b> | <b>19/00</b>  |
| <b>C 07 K</b> | <b>14/435</b> |
| <b>A 61 K</b> | <b>39/35</b>  |
| <b>A 61 K</b> | <b>39/395</b> |

(71) Přihlášovatel:

NOVARTIS AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Mudde Geert C., Vienna, AT;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,  
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Fúzní proteiny, způsob jejich přípravy a  
farmaceutický přípravek, který je  
obsahuje**

(57) Anotace:

Fúzní proteiny obsahující jeden nebo více  
antigenů a jednu nebo více skupin interagujících  
s lidským receptorem Fc.gama. II  
/Fc.gama.RII/ /CD32/.

CZ 437-98 A3

175682/KB

1

Fúzní proteiny, způsob jejich přípravy a farmaceutický přípravek, který je obsahuje

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká komplexů lidského IgG a antigenu/alergenu (nebo kombinace antigenů/alergenů). Týká se fúzních proteinů obsahujících molekuly anti-CD32 a antigenu/alergenu (nebo kombinace antigenů/alergenů). Alergeny jsou v tomto textu definovány jako antigeny, na které odpovídají atopičtí pacienti alergickými reakcemi. Antigeny, jak se používá v tomto textu, mohou být různého původu, např. alergenů ze životního prostředí (např. roztoči z domácího prachu, březový pyl, travní pyl, antigeny koček, antigeny švábů) nebo potravinové alergenů (např. kravské mléko, burské oříšky, garnáti, soja) nebo kombinace obou, nebo nerelevantní antigeny, jako je bovinní sérový albumin (BSA).

### Dosavadní stav techniky

Alergie je nemoc, ve které protilátky IgE zprostředkovávají aktivaci efektorových buněk (mastocytů, bazofilů, eozinofilů), ale také zesilují prezentaci antigenu receptorům s nízkou a vysokou afinitou pro IgE (B buňky, monocyty, dendritické buňky). Tato činnost IgE může být odvrácena specifickými protilátkami IgG, které interagují s CD32 (FcγRII) jak na efektorových, tak na induktorových buňkách. Alergie může být tedy považována za nemoc s nerovnováhou mezi buňkami Th1 a Th2. Úspěch protilátek IgG v působení proti IgE in vivo záleží na relativní koncentraci specifických IgE ke specifickým IgG, a také na izotypu IgG.

Všechny lidské izotypy mají pro CD32 nízkou afinitu, která může být překonána tvorbou komplexu s alergenem, ale mnoho alergenů netvoří komplexy s molekulami IgG dostatečně velké aby umožnily stabilní vazby s CD32.

V současnosti jsou používány dva způsoby aktivní vakcinace užívající alergeny. Nejběžnější je takzvaná „imunoterapie“, která je odkázána na časté imunizace relativně vysokými koncentracemi antigenu. Tato technika je pouze průměrně účinná u menšiny alergických nemocí, jako je alergie na včelí bodnutí a v některých případech rýmy a konjunktivitidy a nedávno několik publikací ukázalo účinnost u astmatu a atopické dermatitidy. Pro podávání alergenů se klasicky používá subkutánní způsob, ale nedávno byl tento způsob srovnán s perorální aplikací a dokonce s lokální aplikací, výsledky jsou obecně pozitivní, ale ne vždy konzistentní. Novější přístup k imunoterapii, takzvaná technika dle Saint-Remyho (viz např. EP 0 178 085 a 0 287 361), používá autologní protilátky IgG spojené do komplexu s příslušnými antigeny in vitro. Tento přístup umožňuje, že jsou aplikována malá množství alergenů s menšími vedlejšími účinky.

Mechanismus v pozadí obou terapií je nejasný. Zdá se, že při klasickém přístupu je prospěšné, jestliže léčba indukuje zvýšení specifických protilátek IgG, ačkoliv ne každé významné zvýšení specifických IgG je v korelaci s úspěšnou imunoterapií. Možnou příčinou je relativně nízká afinita protilátek IgG k CD32 na B buňkách, monocytech a mastocytech. Přístup Saint-Remyho vybírá pacientovy specifické protilátky IgG, které jsou následně míseny s příslušnými antigeny in vitro. Tímto způsobem se zajistí, že alergen nemůže volně reagovat s buňkami nebo jinými protilátkovými izotypy na buňkách, jako je IgE na mastocytech. Kromě toho se

pravděpodobně proti specifickým molekulám IgG získají anti-idiotypové protilátky, které budou následně zabraňovat alergii, což nebylo dosud potvrzeno experimentálními výsledky.

Molekuly IgG jsou důležité v nasměrování imunitní odpovědi od B buněk k monocytům. Proto by měl Saint-Remyho přístup fungovat, když se použije obecný alergen-specifický IgG místo použití alergen-specifického IgG specifického pro dárce. Avšak problém Saint-Remyho přístupu leží v nízké afinitě lidských protilátek IgG pro své receptory Fcγ na B buňkách, v kontrastu s IgE, který se snadno váže k téměř všem buňkám prezentujícím antigen, včetně B buněk, což vede k šíření alergie a indukci buněk Th2. Použití komplexů by mělo obejít problém nízké afinity kvůli zesílené aviditě komplexu ve srovnání se samotnými molekulami IgG, avšak opět kombinace alergenu/IgG v komplexech je nevýhodná, protože přirozený počet epitopů alergenů pro vazbu lidských molekul IgG je méně než pět, což je příliš málo pro zesílení avidity komplexu pro receptory.

#### Podstata vynálezu

U předkládaného vynálezu jsou rizikové faktory klasické imunoterapie sníženy a obcházejí se problémy, na které se naráží při izolaci specifických molekul IgG, a nízká afinita těchto protilátek IgG pro CD32.

IgE navázaný na mastocyty a bazofily indukuje uvolňování histaminu, je-li obsazen antigenem. Kromě toho je IgE schopný zesílit prezentaci antigenu lidskými B buňkami (obrázek 1). Jinak v nepřítomnosti IgE B buňky špatně prezentují antigen, kromě velmi malé části B buněk, která má specifický antigenní receptor. Vychytávání antigenu může nastat pinocytózou, což

ale vyžaduje vysoké koncentrace antigenu a/nebo dlouhé inkubační časy.

Na obrázku 2 je ukázáno, že pinocytóza alergenu po dobu delší než 5 dnů je schopna napodobit prezentaci antigenu zprostředkovanou IgE, ale že prezentace antigenu zprostředkovaná IgG nevede ke stimulaci T buněk. Ve skutečnosti data naznačují, že vytvořením komplexu alergenu s IgG se zabrání prezentaci alergenu.

V další sérii pokusů byl studován vliv těchto komplexů IgG-alergen na prezentaci antigenu zprostředkovanou IgE nebo na vychytávání alergenu pinocytózou. Na obrázku 3 je ukázáno, že komplexy IgG inhibují prezentaci antigenu zprostředkovanou IgE způsobem závislým na dávce, a dále že je inhibována prezentace antigenu po pinocytóze. Tento účinek není antigen-specifický (komplexy IgG/BSA inhibují Der P1-specifickou stimulaci), monomerní (ne v komplexu) IgG neinhibuje prezentaci antigenu.

Toxicita komplexů IgG/alergen je vyloučena pokusem ukázaným na obrázku 4. Komplexy IgG3-Der P1 (pre)inkubované s lidskými monocyty jsou schopny indukovat normální odpověď T buněk. Toto naznačuje, že komplexy IgG/alergen inhibují prezentaci alergenu B buňkami a současně stimulují monocyty a dendritické buňky. Podobně protilátky aCD32 nebo agregované IgG, kterými jsou povlečeny dna jamek, ve kterých se provádí stimulace, inhibují také prezentaci antigenu B buňkami (obrázek 5). Účinnost, se kterou molekuly zaměřené na CD32 inhibují prezentaci antigenu, je nejpravděpodobněji závislá na množství obsazení vazeb molekuly CD32. Avšak zaměření antigenu na CD32 na B buňkách, jako v přirozených komplexech IgG/antigen (obrázek 2) nebo jako ve fúzních proteinech aCD32/antigen podle tohoto vynálezu (obrázky 13a a 13b), nevede k antigenové prezentaci antigenu z komplexu. Na druhé

straně stejné komplexy zaměřené na monocyty indukují antigen-specifickou odpověď T buněk (obrázky 4, 13a a 13b). Tento fenomén může být vysvětlen přítomností CD32B na B buňkách, zatímco monocyty a také dendritické buňky exprimují CD32A. Proto komplexy IgG/antigen, a také fúzní proteiny aCD32/antigen, směřují imunitní odpověď k buňkám monocytových linií a linií dendritických buněk, které indukují T buněčnou odpověď převážně B buněk typu Th1, a další APC (antigen presenting cell - buňka prezentující antigen), které predominantně exprimují CD32B, nebudou prezentovat antigen v komplexu, proto tyto komplexy zabraňují (další) indukci Th2 buněčné odpovědi B buňkami. Interakce mezi komplexem a CD32 nezávisí na intenzivním obsazení (více než 2 molekuly CD32), za předpokladu, že vazba komplexu je dostatečně silná, aby umožnila stabilní interakci. Ve skutečnosti bylo ukázáno, že vazba velmi velkých komplexů, které indukují mnohonásobné obsazení CD32 (napodobené povlakem agregovaného IgG) na monocytech vede k utlumení společných receptorů („co-receptor“), jako je CD80, důležitých pro antigen-specifickou stimulaci T buněk (tabulka 1).

Nezávisle na prezentaci antigenu komplexy IgG/antigen nebo fúzní proteiny aCD32/antigen podle vynálezu také inhibují tvorbu Ig normálními lidskými B buňkami. Na obrázku 14 je ukázáno, že tonsilární B buňky stimulované aCD40 a IL-4 v přítomnosti protilátek aCD32 nebo agregovaných povlečených lidských IgG, které účinně interagují s CD32, nejsou již schopny tvořit déle protilátky. Ošetření fragmenty F(ab) aCD32 je stejně účinné jako použití kompletních protilátek (obrázek 15), což naznačuje, že pro inhibici tvorby Ig po stimulaci aCD40 a IL-4 není nutné obsazení receptoru. B buňky, které jsou stimulovány antigenem přes svůj B buněčný receptor (BCR) potřebují společné obsazení BCR a CD32.

Utlumení tvorby Ig je reverzibilní a závislé na čase. Když se přidají protilátky aCD32 k B buňkám 4 dny po stimulaci aCD40 a IL-4, není pozorována žádná inhibice tvorby Ig. Na obrázku 16 je ukázáno, že také antigen-specifická indukce tvorby protilátek je ošetřením B buněk aCD32 inhibována.

V přírodě molekuly IgG řídí odpověď B buněk interakcí s CD32. Zejména účinky protilátek IgE, které mají obecně pozitivní účinek na (CD23 pozitivní) B buňky, může být neutralizován molekulami IgG. Toto předchází hyperreaktivním imunitním reakcím na antigeny v organismu. U alergie, kde jsou protilátky IgE přítomné v nadbytku, přirozené protilátky IgG při kontrole imunitní odpovědi jasně selhaly. Je zajímavé, že u člověka jsou IgE a IgG regulovány stejným interleukinem, jmenovitě IL-4. Avšak IgG4 má nejnižší afinitu ze všech podtříd lidských IgG pro CD32.

Předkládaný vynález se týká fúzních proteinů obsahujících

a) jeden nebo více antigenů a  
b) jednu nebo více skupin, jako jsou z molekul protilátek, které interagují s lidským receptorem Fcγ II (FcγRII) (CD32), v tomto textu krátce nazývané „fúzní proteiny podle vynálezu“.

Fúzní proteiny podle vynálezu překonávají problémy způsobené nízkou afinitou lidských molekul IgG k CD32. Kombinací protilátky aCD32 mající  $K_d < 10^{-6}$  s antigenem, jsou získány oba, jak negativní (B buňky), tak pozitivní účinky přirozených molekul IgG, včetně selektivní stimulace imunitního systému vedoucí k paměťové indukci Th1/Th0 v nepřítomnosti tvorby protilátky. Účinek je neškodný a směřuje imunitní odpověď k buňkám prezentujícím antigen, které exprimují CD32, pomocí něhož buňky, které predominantně exprimují CD32A, zprostředkovávají prezentaci antigenu

vedoucí k indukci a aktivaci buněk Th1 jako výsledek IL-12 tvořeného buňkami prezentujícími antigen, které exprimují CD32A.

Fúzní proteiny podle vynálezu výhodně postrádají intenzivní obsazování receptoru. Počet vazebných míst pro CD32 je výhodně omezen tak, že se zabrání utlumení stimulačních společných receptorů, jako je CD40, CD80 nebo CD86.

Proteiny také vyřazují efektorovou funkci mastocytů, které nesou části fúzního proteinu specifické pro IgE. Mají následující jedinečné vlastnosti:

- 1) utlumení prezentace antigenu zprostředkované B buňkami (zastavení indukce buněk Th2),
  - 2a) zastavení přepínací indukce IgE,
  - 2b) zastavení tvorby Ig v B buňkách,
- 3) stimulace kompartmentu T buněk interakcí s monocyty a/nebo dendritickými buňkami (stimulace buněk Th1), a
- 4) utlumení mastocytů nesoucích IgE specifické pro části fúzního proteinu.

Obsahují a) jeden nebo více antigenů a b) jednu nebo více skupin z protilátek, které interagují s lidským receptorem Fcγ II.

Části fúzního proteinu, které interagují s receptory Fcγ II, mohou být buď

- 1) kompletní nebo nekompletní (modifikované) lidské nebo humanizované skupiny protilátek IgG, pokud je interakce s těmito receptory stále možná, což předpokládá, že by měl být přítomný celý fragment Fc nebo jeho část, nebo
- 2) lidské nebo humanizované skupiny protilátek aCD32, nebo jejich části, např. fragmenty Fab, které stále specificky rozpoznávají a vážou se k antigenu FcγRII (CD32),

jak je exprimován na B buňkách, mastocytech, monocytech a dendritických buňkách,

např. manipulované lidské nebo humanizované skupiny protilátek aCD32 nebo IgG, nebo jejich části, které rozpoznávají Fc $\gamma$ RII (CD32) s vyšší afinitou než nativní protilátky aCD32 nebo IgG.

Antigeny mohou být z kompletních proteinů nebo jejich částí, které mají stále epitopy pro T buňky v sekvencích přítomných ve fúzním proteinu. Může být použit jakýkoliv antigen, na který alergičtí pacienti odpovídají hypersenzitivními reakcemi zprostředkovanými IgE, jako jsou alergeny u atopické dermatitidy, alergického astmatu, alergické rýmy a alergické konjunktivitidy. Nejběžnější alergeny životního prostředí jsou: roztoči domácího prachu, březový pyl, travní pyl, kočka, šváb. Každý z těchto alergenů má jeden nebo více „hlavních alergenů“ (např. pro roztoče z domácího prachu je hlavní alergen Der P1, pro březový pyl je hlavní alergen Bet V1). Avšak nejsou nutné kompletní antigeny, protože fúzní protein normálně indukuje pouze T buněčné odpovědi a T buňky odpovídají na malé (8 až 12 aminokyselin dlouhé) peptidy. Proto ve fúzním proteinu pro každý alergen může být zahrnut výběr T buněčných epitopů, čímž se snižuje velikost a molekulová hmotnost komplexu. Tak fúzní proteiny mohou být tvořeny z jednoho nebo více úseků DNA obsahujících T buněčný epitop, spíše než z genů kompletních antigenů. Preferuje se překrývání zkříženě reagujících epitopů mezi alergeny. Fúzní protein by se měl specificky vázat k CD32 a obsahovat jeden nebo více např. dva nebo více T buněčných epitopů pro jeden nebo více antigenů/alergenů. Aby se umožnilo správné zpracování antigenů, měly by být výhodně v přípravě fúzních proteinů použity úseky DNA o něco delší než aktuální T buněčný epitop.

Pro fúze s genem kódujícím protilátku aCD32 jsou výhodně použity krátké sekvence DNA, pocházející z klonovaných genů hlavních alergenů, jako je hlavní alergen I roztoče domácího prachu (Der P1), nebo alergen březového pylu (Bet V1). Tyto krátké sekvence DNA obsahují genetický kód pro jeden nebo více T buněčných epitopů, které se po zpracování objeví na povrchu buněk prezentujících antigen, a proto indukují imunitní odpověď v odpovídajících alergen-specifických T buňkách. Pro Der P1 může být většina T buněčných epitopů nalezena v sekvenci v pozicích 101 až 143 v aminokyselinovém jednopísmenném kódu (sekvence s identifikačním číslem 1):

QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREALAQPQRYCRHYWT  
 101        110        120        130        140

Zejména aminokyselinová sekvence v pozicích 101 až 131 v aminokyselinovém jednopísmenném kódu (sekvence s identifikačním číslem 2):

QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREAL  
 101        110        120        130

obsahuje alespoň tři T buněčné epitopy, které se váží k několika molekulám HLA třídy II.

Fúze např. aCD32 a antigenu(ů) může být provedena buď na proteinové úrovni (chemická fúze) nebo genové úrovni (rekombinantní fúzní protein) a vynález také zahrnuje způsob tvoření fúzních proteinů, jak jsou definovány výše. To se provádí obvyklým způsobem a výhodně obsahuje použití techniky rekombinantních genů nebo chemické zesíťení.

Preferují se rekombinantní fúzní proteiny.

Příprava používající techniku rekombinantních genů může být provedena známými metodami, např. následujícím způsobem: genový segment obsahující místo vázající antigen a části oblasti Fc orientované po směru (translace) k exonu CH2 monoklonální protilátky aCD32 (např. klon IV.3) je

amplifikován metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) z např. cDNA IV.3 a klonován. Jako zdroj pro amplifikaci metodou PCR je purifikována příslušná RNA, např. pro amplifikace genu Der P1 z roztoků domácího prachu. Alergenový gen se liguje společně s izolovaným segmentem těžkého řetězce do příslušného savčího expresního vektoru, jako je p350. Kromě toho je izolován kompletní gen odpovídajícího lehkého řetězce z např. IV.3 a klonuje se do příslušného savčího expresního vektoru, jako je p345, který má charakteristické vlastnosti podobné p350. Oba rekombinantní plazmidy jsou použity pro společnou transfekci v např. buňkách COS, aby se umožnilo uvolnění výsledného rekombinantního fúzního proteinu do kultivačního média. Purifikace produktu se výhodně provádí imunoafinitní purifikací založenou na kolonách s protilátkou proti lehkému řetězci, které jsou snadno dostupné ve velkých množstvích.

Alternativně může být použita protilátka jednoduchého řetězce specifická pro CD32 (scFv) pocházející z příslušné fágové expoziční knihovny např. jak popsáno De Kruifem a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, 3938-3942, pro vytvoření rekombinantního fúzního proteinu s geny klonovaných alergenů (obrázek 6). Z fágů se extrahuje fragment DNA a izoluje a klonuje se fragment DNA obsahující semisyntetickou oblast VH DJH fúzovanou s jedním z řetězců VL přes flexibilní spojku (fragment scFv). Fúze s např. genem Der P1 se provádějí za použití definovaných syntetických oligonukleotidů kódujících T buněčné epitopy z Der P1 a dalších hlavních alergenů vybraných pomocí svého vysokého (T buněčného) potenciálu zkřížené reagovat tak, aby se pokrylo co nejvíce pacientů jedním fúzním proteinem. Tyto oligonukleotidy jsou společně ligovány s protilátkovým fragmentem scFv do příslušného savčího expresního vektoru.

Rekombinantní vektor, např. plazmid, je trvale transfekován do příslušných buněk jako jsou COS a/nebo CHO a výsledný fúzní protein je purifikován z buněčného supernatantu např. imunoafinitní chromatografií, jak popsáno výše.

Výsledný rekombinantní gen může být exprimován např. v buňkách CHO, zejména pro produkci ve větším množství, avšak jsou také vhodné jiné systémy pro jeho tvorbu technikou rekombinantních genů, zejména když jsou použity pouze T buněčné epitopy, tj. není zde potřeba glykosylace. Protilátky aCD32 mohou být získány např. z fágové expoziční knihovny pro lidský Ig, která obsahuje pouze fragmenty F(ab) přirozené protilátky. Avšak zdroj genetického materiálu, který kóduje buď protilátku nebo antigen/alergen, není kritický.

Příprava chemickým zesítením může být také prováděna známými metodami, např. pro fúzní protein mezi Mc.a-CD32 a Der P1, použitím metod popsaných autory: Calsson a kol., (Biochem. J., 173, 1978, 723-737), Cumber a kol., (Meth. Enzymol., 112, 1985, 207-224) a Peeters a kol., (J. Immunol. Meth., 120, 1989, 133-143).

Ve stručnosti, Der P1 a Mc.a-CD32 jsou odděleně derivatizovány s SPDP v molárních poměrech 1/20 a 1/5 pro vložení reziduí 2-pyridyldisulfidu. Po mírné redukci a vysolení gelovou chromatografií je Mc.a-CD32 derivatizovaný SPDP (jehož disulfidové skupiny jsou redukovány na thiolové skupiny) inkubován s Der P1 derivatizovaným SPDP v molárním poměru 1/1,6. Výsledný produkt Der P1-Mc.a-CD32 je poté purifikován, např. gelovou filtrací na např. Superose-12 a aniontovou výměnnou chromatografií na FPLC Mono-Q.

Výchozí látky jsou buď známy nebo mohou být připraveny podle známých postupů nebo analogicky ke známým postupům nebo analogicky, jak je v tomto textu popsáno, např. v příkladech.

Fúzní proteiny podle vynálezu jsou použitelné pro prevenci a/nebo léčbu alergií, zejména potravinových alergií. Pro pacienty, kteří trpí anafylaktickou reakcí na konkrétní alergen, není neobvyklé, že mají takovou reakci také na jeden nebo více dalších alergenů. Způsobem předkládaného vynálezu je možné snížit citlivost takového pacienta, pokud jde o dva nebo více alergenů současně, podáváním fúzního proteinu zahrnujícího antigeny proti každému z těchto alergenů. Výhodně budou fúzní proteiny podle vynálezu použity pro prevenci a/nebo léčbu alergie u novorozenců, kteří jsou v riziku potravinové alergie např. na mléko, nebo u stanovených alergií pacientů s alergií proti alergenům, které jsou obsaženy v konkrétním použitém fúzním proteinu.

Pro tyto indikace bude příslušné dávkování ovšem kolísat v závislosti na například konkrétním použitém fúzním proteinu, hostiteli, způsobu aplikace a zamýšlené indikaci. Avšak všeobecně uspokojivé výsledky jsou dosaženy s jednou až třemi vakcinacemi v průběhu jednoho až dvou let, ale je-li nezbytné, mohou být provedeny opakované další vakcinace. Udává se, že pro tyto léčby mohou být podávány fúzní proteiny vynálezu v dávkách a aplikačních režimech, které jsou podobné obvykle používaným.

Vynález se proto také týká použití fúzního proteinu, jak je definován výše, v prevenci a/nebo léčbě alergií, včetně potravinových alergií, a způsobu léčby alergií, který obsahuje podávání pacientovi potřebujícímu takovou léčbu profylakticky nebo léčebně účinné množství fúzního proteinu, jak je definován výše, spolu s alespoň jedním obvyklým farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem, a také fúzní proteiny, jak jsou definovány výše, pro použití jako farmaceutický, zejména antialergický přípravek.

Fúzní proteiny podle vynálezu mohou být míseny s obvyklými farmaceuticky přijatelnými ředidly a nosiči a s dalšími excipienty dle volby a podávány parenterálně, intravenózně nebo enterálně, např. intramuskulárně nebo subkutánně. Koncentrace fúzního proteinu ovšem kolísají v závislosti na použité sloučenině, na požadované léčbě a na povaze farmaceutické formy.

Vynález tedy také zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující fúzní protein, jak je definován výše, společně s alespoň jedním farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

Dále se týká způsobu přípravy léčiva proti alergiím, který obsahuje smísení fúzního proteinu, jak je definován výše, spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem, a použití fúzního proteinu, jak je definován výše, pro výrobu léčiva pro prevenci a/nebo léčbu alergií, včetně potravinových alergií.

V tomto textu jsou použity následující zkratky:

|        |                                                                              |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|
| aCD32  | protilátka k CD32 (protilátka anti-CD32)                                     |
| Ag     | antigen                                                                      |
| APC    | buňka prezentující antigen                                                   |
| BCR    | B buněčný receptor                                                           |
| Bet V1 | hlavní alergen březového pylu                                                |
| BSA    | bovinní sérový albumin                                                       |
| CNBR   | cyanobromid                                                                  |
| Der P1 | hlavní alergen roztoče z domácího prachu<br>(Dermatophagoides pteronyssinus) |
| DPT    | antigen roztoče z domácího prachu                                            |
| DTT    | dithiotreitol                                                                |
| EBV    | virus Epstein-Barrové                                                        |

|        |                                           |
|--------|-------------------------------------------|
| ELISA  | imunotest s enzymatickou detekcí          |
| FACS   | fluorescenční třidič buněk                |
| FcγRII | lidský receptor Fcγ II (= CD32)           |
| FPLC   | rychlá tlaková kapalinová chromatografie  |
| GaM    | kozí protimysí protilátka                 |
| HAc    | kyselina octová                           |
| HLA    | lidský leukocytární antigen               |
| HPHT   | hydroxyapatit                             |
| IC     | imunokomplex                              |
| Ig     | imunoglobulin                             |
| IL-12  | interleukin-12                            |
| LST    | stimulační test lymfocytů                 |
| min    | minuty                                    |
| MR     | molární poměr                             |
| PBS    | fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem     |
| PCR    | polymerázová řetězová reakce              |
| p-NPP  | p-nitrofenylfosfát                        |
| sd     | směrodatná odchylka                       |
| SPDP   | N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionát |

### Popis obrázků

Obrázek 1: Vazba komplexů Der P1-(3)NIP k CD23 ve vztahu k prezentaci antigenu:

Panel A = fluorescence, panel B = proliferace.

EBV B buňky byly pulsně modulovány předformovanými IC (imunokomplexy), které se skládají z IgE v konstantní koncentraci (▲7,5 µg/ml, ●5,0 µg/ml, ■2,5 µg/ml) a z Der P1-(3)NIP v proměnlivých koncentracích.

V panelu A je ukázána vazba předformovaných IC k B buňkám. IC s totožnými MR jsou spojeny čarou a aktuální MR (0,1, 0,25, 0,5, 1, 7) je udán arabskými číslicemi u čáry.

Vazba IgE dosáhla stabilní hladiny v koncentraci Der P1 0,2  $\mu\text{g/ml}$ . Vazba IgE v nepřítomnosti Der P1-(3)NIP je ukázána v tečkovaném rámečku v dolní části pravé osy Y.

V panelu B je ukázána prezentace antigenu ozářenými EBV-B buňkami, které byly pulsně modulovány týmiž IC. V tomto panelu spojovací čáry ukazují komplexy tvořené totožnými koncentracemi IgE, aby se zdůraznilo, že prezentace antigenu nebyla ovlivněna MR imunokomplexů IC (korelační koeficient = 0,96). Také monomerní komplexy (nejvyšší koncentrace Der P1-(3)NIP v každé čáře) byly účinně prezentovány T buňkám. Nebyla pozorována žádná stimulace T buněk jakoukoliv z použitých koncentrací Der P1-(3)NIP (šrafovaná oblast) v nepřítomnosti molekul IgE. Data ukazují inkorporaci  $^3\text{H}$ -thymidinu 5. den (průměr  $\pm$  sd z triplikátu jamek).

Obrázek 2: Srovnání prezentace antigenu B buňkami, které nebyly pulsně modulovány:

Volný Der P1-(2)NIP ponechaný v kultivačním médiu během celého stimulačního období indukoval stimulaci T buněk závislou na dávce. Autologní (ozářené) EBV-B buňky byly použity jako buňky prezentující antigen. IgE přítomný v komplexech nezvýšil významně prezentaci antigenu, ale oba IgG1 a IgG3 přítomné v IC zabránily antigenové prezentaci Der P1-(2)NIP T buňkám, jak srovnáno s volným Der P1-(2)NIP. Výsledky jsou předloženy jako inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu 5. den (průměr  $\pm$  sd z triplikátu jamek).

Obrázek 3: Inhibice prezentace antigenu komplexy IgG-Der P1-(3)NIP:

V nepřítomnosti IgG3 je nalezena dobrá T buněčná stimulace, když jsou použity komplexy IgE-Der P1-(3)NIP. Titrace předformovaných komplexů IgG3-Der P1-(3)NIP ve

stejném (1:1) poměru vede k inhibici prezentace antigenu zprostředkované IgE, která je závislá na dávce. Aby měly tento účinek, je potřebné, aby byly komplexy IgG3 přítomné v kultivačním médiu v době T buněčné stimulace. Preinkubace nebo „impulsové modulování“ B buněk komplexy IgG3 není úspěšné v důsledku nízké afinity IgG3 pro CD32 na B buňkách. Podobná inhibice se pozoruje u prezentace antigenu v nepřítomnosti IgE, a také s komplexy IgG3-BSA-(3)NIP.

Obrázek 4: prezentace antigenu čerstvými lidskými monocyty zprostředkovaná IgG3:

Lidské monocyty jsou pulsně modulovány předformovanými komplexy IgG3-Der P1-(3)NIP (poměr 1:1) 1 hodinu na ledu v nepřítomnosti nebo přítomnosti nerelevantního agregovaného lidského IgG. Modulované monocyty jsou následně promyty a smíseny s klony T buněk souhlasnými v HLA-DP a specifickými pro Der P1, a po 5 dnech se měří proliferace jako inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu. Komplexy IgG3 prezentované lidskými monocyty indukují alergen-specifickou T buněčnou odpověď, která může být blokována agregovaným IgG, což ukazuje specifitu interakce IgG3 s monocyty. Data jsou ukázána jako průměr ± sd z triplikátu jamek.

Obrázek 5: DPT-specifická T buněčná proliferace: vliv aCD32 nebo agregovaného lidského IgG na prezentaci antigenu:

Lidské EBV B buňky jsou pulsně modulovány s (černé sloupce) nebo bez (bílé sloupce) 250 µg/ml DPT přes noc. Po ozáření jsou B buňky smíseny s T buňkami z Der P1-specifického T buněčného klonu a buňky se nechají 5 dnů proliferovat. V přítomnosti různých koncentrací protilátek aCD32 obsazených GaM se pozoruje inhibice proliferace závislá na dávce. Stejný účinek se pozoruje, když jsou kultivační

jamky povlečeny aCD32 nebo nespecifickým agregovaným lidským IgG.

Obrázek 6: Příklady rekombinantních fúzních proteinů mezi aCD32 fragmenty scFv (Fab) pocházejícími z fágové expoziční knihovny:

Fragmenty Fab mohou být získány z fágové expoziční knihovny, jak je popsáno De Kruifem a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, 3938-3942. Avšak fragment aCD32 Fab může být nahrazen jakoukoliv molekulou (nebo částí molekuly), která účinně interaguje s lidskou CD32. Alergen může být jakýkoliv protein nebo kombinace proteinů, která způsobí alergii. Kromě toho alergen(y) může být nahrazen fragmenty alergenu(ů), které obsahují T buněčné epitopy. Rekombinantní protein může být tvořen v jakémkoliv dostupném expresním systému, nezávisle na glykosylaci a dalších post-translačních modifikacích. Takové fúzní proteiny mohou být také použity u nemocí, které jsou charakterizovány (nadměrnou) tvorbou nežádoucích molekul Ig, jako revmatoidní artritida, odhojování štěpu nebo jakákoliv další nemoc, ve které hrají roli autoprotilátky. V těchto případech mohou být alergeny nahrazeny jednoduchou nedefinovanou spojkou, aby se zkombinovaly dvě skupiny aCD32, avšak nejlepších výsledků se dosáhne při nahrazení alergenu „autoantigenem“, který způsobuje nemoc.

Obrázek 7: Stanovení Der P1 ve frakčních skupinách konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 purifikovaného v Superose-12 testem ELISA

Obrázek 8: Stanovení Mc.a-CD32 ve frakčních skupinách konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 purifikovaného v Superose-12 testem ELISA

Obrázek 9: Stanovení konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 ve frakčních skupinách purifikovaných v Superose-12 testem ELISA:

Povlak: Mc.a-Der P1.

Obrázek 10: Stanovení konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 ve frakčních skupinách purifikovaných v Superose-12 testem ELISA:

Povlak: Pc.a-myší IgG2b.

Obrázek 11: Barvení frakcí ze skupin A, B a C stříbrem:

Dráha 1: 350 ng Der P1

Dráha 2: 50 ng Mc.a-CD32

Dráha 3: 500 ng standardu o vysoké molekulové hmotnosti

Dráha 4: 500 ng počáteční látka pro Superose-12

Dráha 5: 100 ng Superose-12 skupina A

Dráha 6: 100 ng Superose-12 skupina B

Dráha 7: 200 ng Superose-12 skupina C

Dráha 8: 250 ng standardu o vysoké molekulové hmotnosti

Standard o vysoké molekulové hmotnosti:

669 kD: thyreoglobulin

440 kD: feritin

232 kD: kataláza

140 kD: laktátdehydrogenáza

67 kD: bovinní sérový albumin

Obrázek 12: Barvení purifikovaného fúzního proteinu ze skupiny C stříbrem:

Dráha 1: 250 ng standardu o vysoké molekulové hmotnosti

Dráha 2: 45 ng látky purifikované na FPLC-Mono-S.

Obrázky 13a a 13b: Ag-specifická T buněčná proliferace:

Obr. 13a: APC-Mo 250495 a CFB4:2

Obr. 13b: Vliv monomerního purifikovaného CD32/Der P1 aCD32 (klon Medarex IV.3) chemicky spojený s purifikovaným Der P1 byl použit ke stimulaci Der P1-specifického T buněčného klonu CFTS4:3.1, v různých koncentracích, za použití standardu LST (Van Reijsen, F.C. a kol., 1992, J. Allergy Clin. Immunol. 90, 184). V první sérii experimentů (obr. 13a) byly použity skupiny A a B z chemicky fúzovaných preparátů: skupina A obsahující jeden pás o velikosti 700 kD (což jsou 2 molekuly aCD32 fúzované s 10 molekulami Der P1) a skupina B skládající se ze dvou pásů 460 kD a 330 kD (což je 1 aCD32 fúzovaná s 10 Der P1, a 1 aCD32 s 5 molekulami Der P1).

Ve druhé sérii pokusů (obr. 13b) byl použit purifikovaný protein (CP230595) ze skupiny C, skládající se z jednoho pásu o velikosti 330 kD (1 molekula aCD32 fúzovaná s 5 molekulami Der P1).

Monocyty a B buňky byly preinkubovány 1 hodinu při teplotě místnosti s různými frakcemi, jak ukazuje obrázek. Jako kontrolní stimulace bylo k T buňkám a buňkám prezentujících antigen přidáno 100 µg/ml DPT během celého kultivačního období. T buněčná stimulace se měřila jako inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu (průměr ± sd ze 4 jamek) po 5 dnech, jak popsáno (Van Reijsen a kol., výše). B buňky byly schopny stimulovat CFTS4:3.1 s DPT, ale ne se skupinou A, B nebo C, zatímco monocyty byly schopny stimulovat CFTS4:3.1 s DPT a se skupinou A, B a C. Toto odpovídá předchozím nálezům s přirozenými komplexy IgG/alergen (Bheekha Escura, R. a kol., Immunology, 1995, 86, 343). Navíc to naznačuje, že pro antigenní stimulaci monocyty není nutné obsazení více než 2

molekul CD32, protože všechny frakce byly stejně účinné ve stimulaci T buněk.

Obrázek 14: Inhibice IgE a syntéza IgG1:

Purifikované lidské tonsilární B buňky byly stimulovány aCD40 a IL-4, jak popsáno v práci Armerding, D., a kol., Immunobiology, 188, 1993, 259-273, v přítomnosti a nepřítomnosti komerčně dostupných protilátek aCD32 přidáných v udaných koncentracích. Po 9 dnech byly supernatanty z tkáňových kultur testovány na obsah IgE a IgG1, jak popsáno (Armerding, D., a kol., výše). Výsledky jsou ukázány jako tvorba protilátek ze tří spojených frakcí z devíti opakování (průměr  $\pm$  sd). Všechny protilátky aCD32 inhibovaly tvorbu IgE, a také IgG1, způsobem závislým na dávce. Inhibice IgM a IgA byla srovnatelná.

Obrázek 15: Inhibice syntézy IgE:

Purifikované lidské tonsilární B buňky byly stimulovány aCD40 a IL-4, jak popsáno v práci Armerding, D., a kol., výše, v přítomnosti a nepřítomnosti komerčně dostupné protilátky aCD32 (Medarex IV.3) nebo jejích fragmentů Fab, přidáných v udaných koncentracích. Po 9 dnech byly supernatanty z tkáňových kultur testovány na obsah IgE a IgG1, jak popsáno (Armerding, D., a kol., výše). Výsledky jsou ukázány jako tvorba protilátek ze tří spojených frakcí z devíti opakování (průměr  $\pm$  sd). Jak kompletní protilátka, tak fragmenty Fab, z klonu Medarex IV.3, byly schopny inhibovat syntézu IgE (IgG1, IgM a IgA).

Obrázek 16: DPT specifická indukce IgE: vliv aCD32:

Lidské tonsilární B buňky jsou pulsně modulovány s (černé sloupce) nebo bez (bílý sloupec) 250  $\mu$ g/ml DPT přes

noc. Po ozáření jsou B buňky smíseny s T buňkami z Der P1-specifického T buněčného klonu (CFTS4:3.1) a buňkám je umožněno 9 dnů proliferovat a tvořit protilátky. Po 9 dnech byly supernatanty z tkáňových kultur testovány na obsah IgE a IgG1, jak popsáno v práci Armerding, D., a kol., výše. Výsledky jsou ukázány jako tvorba protilátek ze tří spojených frakcí z devíti opakování (průměr  $\pm$  sd). V přítomnosti různých koncentrací protilátek aCD32 je pozorována inhibice tvorby IgE závislá na dávce. To naznačuje, že dokonce u analogické interakce B a T buněk, protilátky aCD32 blokují syntézu protilátek.

V následujících příkladech, které ilustrují vynález, aniž by ho omezovaly, jsou všechny teploty ve stupních Celsia.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

Příprava a purifikace Der P1-monoklonálního anti-CD32 fúzního proteinu

##### A) Metoda:

Der P1 je kovalentně konjugován k Mc.a-CD32 za použití SPDP, dvojfunkční spojovací reagentie. Ve stručnosti, Der P1 a Mc.a-CD32 jsou odděleně derivatizovány s SPDP v molárních poměrech 1/20 a 1/5 pro vložení reziduí 2-pyridyldisulfidu. Po mírné redukci a vysolení gelovou chromatografií je Mc.a-CD32 derivatizovaný SPDP (jehož disulfidové skupiny jsou redukovány na thiolové skupiny) inkubován s Der P1 derivatizovaným SPDP v molárním poměru 1/1,6. Výsledný konjugát Der P1--Mc.a-CD32 je purifikován gelovou filtrací na

Superose-12 a aniontovou výměnnou chromatografií na FPLC Mono-Q.

B) Materiál:

a) SPDP: molekulová hmotnost 312,4, 25,61 mM zásobní roztok (8 mg/ml v dimetylformamidu, připravený bezprostředně před kopulační reakcí,

b) Der P1: purifikovaný imunoafinitní chromatografií na Mc.a-Der P1 (4C1/B8/3F8) kovalentně spojeného s CNBR-Sepharose 4B. Molekulová hmotnost 28 kD, izoelektrický bod 5,0 (PHAST-IEF), sterilizován filtrací, naředěný v PBS,

c) monoklonální anti-CD32 (IV.3): izotyp:  $\kappa$  řetězec myšího IgG2b, molekulová hmotnost 150 kD, izoelektrický bod 6,2 (PHAST-IEF), purifikovaný ze supernatantu tkáňové kultury na Protein-A a HPHT a dialyzován proti PBS.

Reakční směs A:

K 1,2 ml roztoku Der P1 (0,84 mg) se přidá 23,4  $\mu$ l zásobního roztoku SPDP (v nadbytku molárního dvacetinásobku) a směs se míchá v konické reakční zkumavce o objemu 2,5 ml (Pierce) po dobu 45 minut při teplotě místnosti (22°). Reakční směs se doplní na 2,5 ml PBS a nekonjugovaný SPDP a uvolněný N-hydroxysukcinimid se odstraní vysolením na vysolovací koloně Pharmacia PD-10 o objemu 9,1 ml pro jedno použití (Sephadex G-25), která je ekvilibrovaná 50 ml PBS. Po aplikaci je eluována frakce obsahující Der P1 aktivovaný 2-pyridyldisulfidem a sloučena s 3,5 ml PBS. Koncentrace je 0,17 mg/ml, což odpovídá 0,6 mg.

Stanovení stupně substituce 2-pyridyldisulfidem:

100  $\mu$ l vzorku se doplní na 150  $\mu$ l PBS a přidá se 50  $\mu$ l 150 mM DTT, naředěného PBS. Koncentrace pyridin-2-thionu uvolněného po přidání DTT se určuje měřením absorpance ve

343 nm (molární extinkční koeficient:  $8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a odpovídá vloženým reziduím 2-pyridyldisulfidu. Substituční stupeň je vypočítán jako 1,5 mol 2-pyridyldisulfidu / mol Der P1 z nárůstu OD 0,074 měřené při 343 nm (korigováno s ohledem na ředění).

#### Reakční směs B:

K 0,5 ml roztoku Mc.a-CD32 (4,2 mg) se přidá 5,5  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku SPDP (v nadbytku molárního pětinasobku) a směs se míchá po dobu 45 minut při teplotě místnosti. Reakční směs se aplikuje na vysolovací kolonu Pierce GF-5 o objemu 2,5 ml pro jedno použití (ekvilibrovanou 10 ml 0,1 M pufru Na-acetát/HAc, 0,1 M NaCl, pH 4,5). Po aplikaci se eluuje vysolená frakce a sloučí se s 1,5 ml acetátového pufru (pH 4,5) a filtruje se na filtrační jednotce MILLEX-GV s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (s nízkou vazbou proteinu).

#### Vložení skupin SH:

2-pyridyldisulfidové skupiny vázající protein jsou konvertovány na thiolové skupiny vázající protein redukcí s DTT. 1,5 ml vysoleného vzorku se inkubuje za míchání s 1 ml 62,5 mM DTT (ředěného acetátovým pufrem) při teplotě místnosti po dobu 30 minut (konečná koncentrace DTT je 25 mM). Protože 2-pyridyldisulfidy zvyšují svoji elektrofilnost při kyselém pH, redukce může být stále prováděna při nízkém pH, kdy nejsou poškozeny nativní proteinové disulfidové vazby.

Pro nárůst OD 0,447 měřené při 343 nm je vypočten substituční stupeň jako 7 mol thiolových skupin / mol Mc.a-CD32.

Reakční směs se aplikuje na kolonu Pharmacia PD-10 (ekvilibrovanou 50 ml PBS) a po aplikaci je vysolená frakce

eluována a sloučena s 3,5 ml PBS. Vzorek se koncentruje na 0,6 ml koncentrační jednotkou CENTRIPLUS-10 (membrána YM10). Koncentrace je 3,1 mg/ml, což odpovídá 1,86 mg.

C) Kopulační postup:

3,3 ml (0,56 mg) Der P1 (aktivovaného pyridyldisulfidem) a 0,6 ml (1,86 mg) Mc.a-CD32 (aktivovaného SH) se smísí a míchají v Pierceho reakční zkumavce o objemu 5 ml po dobu 2 hodin při teplotě místnosti (22°) a 15 hodin při teplotě +4°. Molární poměr Der P1 / Mc.a-CD32 v reakční směsi je 1,6/1. Kopulační reakce se monitoruje měřením zvýšení OD při 343 nm následkem nárůstu uvolněného pyridin-2-thionu:

| Čas     | OD(343 nm) |
|---------|------------|
| začátek | 0,1112     |
| 15 min  | 0,1257     |
| 30 min  | 0,1342     |
| 45 min  | 0,1412     |
| 60 min  | 0,1470     |
| 75 min  | 0,1519     |
| 120 min | 0,1590     |

D) Purifikace konjugátu:

Superose-12:

Reakční směs (3,9 ml) se filtruje filtrační jednotkou MILLEX-GV s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m a koncentruje se na 0,5 ml koncentrační jednotkou Centriplus-10. Konečná koncentrace konjugátu je 3,7 mg/ml, což odpovídá 1,9 mg.

Vzorek se aplikuje na kolonu Superose-12 (HR10/30) (Pharmacia) ekvilibrovanou PBS. Objem vrstvy 24 ml, průtoková rychlost 0,2 ml/min, objem/frakce 0,4 ml, rychlost posunu zapisovače 1,5 mm/min, tlak 0,3 MPa, vlnová délka snímání

280 nm. Eluované frakce s vysokou molekulovou hmotností jsou rozděleny podle elučního profilu do 3 skupin:

1,2 ml skupina A: frakce č. 21-23

1,2 ml skupina B: frakce č. 24-26

1,2 ml skupina C: frakce č. 29-31

Skupiny jsou sterilizovány filtrací (MILLEX-GV o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ ) a uskladněny za sterilních podmínek v +4°. Celková proteinová koncentrace je: skupina A: 100  $\mu\text{g/ml}$ , skupina B: 200  $\mu\text{g/ml}$ , skupina C: 390  $\mu\text{g/ml}$ .

FPLC-Mono Q:

1 ml skupiny C (390  $\mu\text{g}$ ) se dialyzuje v pufru 20 mM ethanolamin/HCl, 0,01%  $\text{NaN}_3$ , pH 9,0, a purifikuje se iontovou výměnnou chromatografií na aniontovém výměníku FPLC-Mono Q (HR5/5). Počáteční pufr A: 20 mM ethanolamin/HCl, 0,01%  $\text{NaN}_3$ , pH 9,0, konečný pufr B: A + 0,5 M NaCl, pH 9,0, průtoková rychlost 1 ml/min, objem/frakce 1 ml, rychlost posunu zapisovače 5 mm/min, tlak 1,2 MPa, vlnová délka snímání 280 nm. Po aplikaci se nastartuje lineární gradientový program po dobu 30 minut (konduktivita 50 - 1260  $\mu\text{S/cm}$ ). Příslušný vrchol se eluuje ve frakci č. 8 (ve 340  $\mu\text{S/cm}$ ). Proteinová koncentrace je 45  $\mu\text{g/ml}$  (OD 280 nm,  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  14,0). Vzorek se dialyzuje v PBS a sterilizuje filtrací. Proteinová koncentrace konečné purifikované látky je 20  $\mu\text{g/ml}$  (OD 280 nm).

E) Analytická stanovení:

a) Konečná proteinová koncentrace:

Konečné proteinové koncentrace se stanovují podle Bradforda, za použití Protein Assay Kit I, BIO-RAD, jako standard se používá bovinní Ig.

b) Stanovení Der P1, Mc.a-CD32 a konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 testem ELISA:

Testy ELISA na pevné fázi se provádějí na mikrotitračních destičkách z PVC. Povlakový („coating“) pufr 0,1 M  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,01%  $\text{NaN}_3$ , pH 9,6, PBS s 0,05% Tween-20 se použije jako promývací roztok a 2% fetální telecí sérum v promývacím pufru se použije jako ředidlo pro vzorky, biotinové a enzymové konjugáty. Substrát je 1 mg/ml p-NPP naředěný v pufru 1 M diethanolamin/HCl, pH 9,8. Zastavovací roztok je 2 M NaOH. Všechny inkubační kroky se provádějí ve zvlhčované komoře. Zařízení pro zpracování vzorků a čtení OD ve 405 nm je laboratorní stanice Beckman Biomek-1000. Kvantitativní stanovení: Beckman Immunofit, prokládání křivky: křivkou se čtyřmi parametry.

B)1) Stanovení Der P1 (obr. 7):

Povlak (coating): 100  $\mu\text{l}$ /jamku Mc.a-Der P1 (5H8) v koncentraci 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  přes noc ve  $+4^\circ$ . Po promytí se přidá 100  $\mu\text{l}$ /jamku vzorku:

- a) Der P1 (výchozí látka pro spojování) (250-0,49 ng/ml) jako standard
- b) Superose-12 skupina A (4000-7,81 ng/ml)
- c) Superose-12 skupina B (4000-7,81 ng/ml)
- d) Superose-12 skupina C (4000-7,81 ng/ml)

Inkubace je 2 hodiny v  $+37^\circ$ . Po promytí se přidá 100  $\mu\text{l}$ /jamku Mc.a-Der P1 (4C1/B8/3F8) konjugovaného s biotinem, naředěného 1/500 a inkubuje se 2 hodiny v  $+37^\circ$ . Po promytí se přidá 50  $\mu\text{l}$ /jamku konjugátu streptavidin-alkalická fosfatáza, naředěného 1/1000 a inkubuje se 1 hodinu v  $+37^\circ$ . Po promytí se přidá 100  $\mu\text{l}$ /jamku substrátu, inkubuje se 60 minut ve  $37^\circ$  a reakce se zastaví. Kvantitativní vyhodnocení ze standardní křivky:

Superose-12 skupina A: 16,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Superose-12 skupina B: 54,9 µg/ml

Superose-12 skupina C: 135 µg/ml

b)2) Stanovení Mc.a-CD32 (myší IgG2b) (obr. 8):

Povlak: 100 µl/jamku koziho Pc.a-myšího IgG2b (Southern) v koncentraci 5 µg/ml přes noc ve +4°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku vzorku:

a) Mc.a-CD32 (výchozí látka pro spojování) (1000-1,96 ng/ml) jako standard

b) Superose-12 skupina A (8000-15,63 ng/ml)

c) Superose-12 skupina B (8000-15,63 ng/ml)

d) Superose-12 skupina C (8000-15,63 ng/ml)

Inkubace je 2 hodiny v +37°. Po promytí se přidá 50 µl/jamku koziho Pc.a-myšího IgG2b (Southern) konjugovaného s alkalickou fosfatázou, naředěného 1/1000 a inkubuje se 2 hodiny v +37°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku substrátu, inkubuje se 15 minut při teplotě místnosti a reakce se zastaví. Kvantitativní vyhodnocení ze standardní křivky:

Superose-12 skupina A: 17,7 µg/ml

Superose-12 skupina B: 58,8 µg/ml

Superose-12 skupina C: 190 µg/ml

Stanovení molárního poměru Der P1 /Mc.a-CD32 v konjugátu podle testu ELISA:

Superose-12 skupina A: 4,9/1

Superose-12 skupina B: 5,0/1

Superose-12 skupina C: 3,8/1

b)3) Detekce konjugátu Der P1--Mc.a-CD32:

b)3)1) Povlak: Mc.a-Der P1 (myší IgG2a) (obr. 9):

Povlak: 100 µl/jamku Mc.a-Der P1 (5H8) v koncentraci 10 µg/ml přes noc ve +4°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku vzorku:

- a) Der P1 (výchozí látka pro spojování) (4000-7,81 ng/ml)
- b) Superose-12 skupina A (4000-7,81 ng/ml)
- c) Superose-12 skupina B (4000-7,81 ng/ml)
- d) Superose-12 skupina C (4000-7,81 ng/ml)

Inkubace je 2 hodiny v +37°. Po promytí se přidá 50 µl/jamku koziho Pc.a-myšního IgG2b (Southern) konjugovaného s alkalickou fosfatázou, naředěného 1/1000 a inkubuje se 2 hodiny v +37°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku substrátu, inkubuje se 30 minut při teplotě místnosti a reakce se zastaví. Na Mc.a-Der P1 navázaný konjugát Der P1--Mc.a-CD32 se detekuje oddělením Mc.a-CD32 v každé frakční skupině purifikované na Superose-12.

b)3)2) Povlak: Pc.a-myší IgG2b (obr. 10):

Povlak: 100 µl/jamku koziho Pc.a-myšního IgG2b (Southern) v koncentraci 5 µg/ml přes noc ve +4°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku vzorku:

- a) Der P1 (výchozí látka pro spojování) (1000-1,95 ng/ml)
- b) Superose-12 skupina A (8000-15,63 ng/ml)
- c) Superose-12 skupina B (8000-15,63 ng/ml)
- d) Superose-12 skupina C (8000-15,63 ng/ml)

Inkubace je 2 hodiny v +37°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku Mc.a-Der P1 (4C1/B8/3F8) konjugovaného s biotinem (myší IgG1), naředěného 1/500 a inkubuje se 2 hodiny v +37°. Po promytí se přidá 50 µl/jamku konjugátu streptavidin-alkalická fosfatáza, naředěného 1/1000 a inkubuje se 1 hodinu v +37°. Po promytí se přidá 100 µl/jamku substrátu, inkubuje se 60 minut ve 37° a reakce se zastaví. Na Pc.a-myší IgG2b navázaný konjugát Der P1--Mc.a-CD32 se

detekuje oddělením Der P1 v každé frakční skupině purifikované na Superose-12.

C) Stanovení molekulové hmotnosti konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 nativní gradientovou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu:

Molekulová hmotnost konjugátů Der P1--Mc.a-CD32 ve frakčních skupinách purifikovaných na Superose-12 se stanoví pomocí nativního gelu PHAST o gradientu 4 až 15 % (Pharmacia) (separační rozmezí: 1000 kD až 150 kD) srovnáním s nativními standardními proteiny s vysokou molekulovou hmotností (kit, Pharmacia).

Detekce: barvení stříbrem (Silver staining kit, Pharmacia) (obr. 11)

Stanovení:

Superose-12 skupina A: pás o m.h. 700 kD

Superose-12 skupina B: pás o m.h. 460 kD, 330 kD

Superose-12 skupina C: pás o m.h. 330 kD, 170 kD

Molekulová hmotnost konečného konjugátu Der P1--Mc.a-CD32 purifikovaného na FPLC-Mono Q je určena jako 330 kD (obr. 12).

F) Výsledky testu:

a) Antigen-specifická stimulace T buněčného klonu CFTS4:3.1 fúzním proteinem aCD32 Der P1:

aCD32 (Medarex klon IV.3) chemicky spojený, jak uvedeno výše, s purifikovaným Der P1, je použit ke stimulaci Der P1 - specifického T buněčného klonu CFTS4:3.1 v různých koncentracích za použití standardního LST. V první sérii pokusů jsou použity skupiny A a B z chemicky fúzovaných preparátů, skupina A obsahuje jeden pás o velikosti 700 kD (2 molekuly aCD32 fúzované s 10 molekulami Der P1) a skupina B

se skládá ze dvou pásů, ve 460 kD a 330 kD (1 aCD32 s 10 Der P1, a 1 aCD32 s 5 molekulami Der P1).

Ve druhé sérii pokusů je použit purifikovaný protein ze skupiny C, obsahující jeden pás o velikosti 330 kD (1 molekula aCD32 fúzovaná s 5 molekulami Der P1). Monocyty a B buňky jsou preinkubovány 1 hodinu při teplotě místnosti s různými frakcemi, jak je ukázáno na obrázcích 13a a 13b. Jako kontrolní stimulace je k T buňkám a buňkám prezentujícím antigen přidáno 100 µg/ml DPT během celého kultivačního období. B buňky jsou schopné stimulovat CFTS4:3.1 s DPT, ale ne se skupinou A, B nebo C, zatímco monocyty jsou schopny stimulovat CFTS4:3.1 s DPT a se skupinami A, B a C. Toto potvrzuje dřívější nálezy s přirozenými komplexy IgG/alergen, které jsou zmíněny výše. Kromě toho to naznačuje, že pro antigenovou stimulaci monocyty není nutné obsazení CD32, protože všechny frakce stimulují T buňky stejně dobře.

#### b) Inhibice syntézy IgE:

Purifikované lidské tonsilární B buňky jsou stimulovány aCD40 a IL-4 v přítomnosti a nepřítomnosti komerčně dostupných protilátek aCD32, které jsou přidány v udaných koncentracích (obr. 14). Po 9 dnech jsou testovány supernatanty tkáňových kultur na obsah IgE a IgG1. Všechny protilátky aCD32 inhibují tvorbu IgE, a také IgG, způsobem závislým na dávce. Na obr. 15 je ukázáno, že dokonce fragmenty Fab z klonu Medarex IV.3 jsou schopny inhibovat syntézu IgE. To naznačuje, že B buňky, které nejsou aktivovány přes své BCR, mohou být blokovány ve své protilátkové tvorbě monomerní interakcí s CD32. Pro B buňky, které jsou stimulovány způsobem antigen-specifickým, je nezbytné společné obsazení vazeb mezi CD32 a BCR. To naznačuje, že např. u alergie, kde B buňky vychytávají

antigen (např. Der P1) přes IgE a CD23, a následně se stávají stimulovanými Der P1-specifickými buňkami Th2, což vede ke tvorbě IgE B buňkami, mohou tyto B buňky ukončit činnost interakcí s CD32 na povrchu B buněk. Vskutku, dokonce u analogické interakce B a T buněk, blokuji protilátky aCD32 protilátkovou syntézu (obr. 16).

Tabulka 1

| Stimulace                                    | %CD80 | %CD40 | %HLA-DR |
|----------------------------------------------|-------|-------|---------|
| den 0 (čerstvě izolováno)                    | 1     | 26    | 99      |
| den 1 IFN- $\gamma$                          | 31    | 82    | 99      |
| den 1 IFN- $\gamma$ + agregovaný IgG         | 13    | 61    | 99      |
| den 1 IFN- $\gamma$ + agregovaný IgG + aCD32 | 32    | 82    | 99      |

Monocyty (91 % CD14 pozitivních) získané od zdravého dárce elutriací jsou inkubovány se 100 U/ml IFN- $\gamma$  po dobu 24 hodin v přítomnosti nebo nepřítomnosti agregovaného lidského IgG v koncentraci 5  $\mu$ g/ml (povlak v jamkách, přes noc ve 4°) a/nebo monoklonálního myšího anti-lidského aCD32 (Medarex IV.3) v koncentraci 10  $\mu$ g/ml, a následně obarveny pro určení uvedených markerů analýzou FACS. Zvýšení CD80 a CD40 indukované IFN- $\gamma$  může být inhibováno silným obsazením receptorů Fc $\gamma$  agregovaným lidským IgG na monocyttech. Preinkubace s aCD32 působí proti inhibici agregovaným lidským IgG, což naznačuje, že

- 1) inhibice agregovaným lidským IgG je zprostředkována CD32,

a

2) pouhá vazba na CD32 nezpůsobí utlumení společných receptorů.

Exprese HLA-DR není ošetřením ovlivněna.

#### Průmyslová využitelnost

Předkládaný vynález se týká komplexů lidského IgG a antigenu/alergenu. Týká se fúzních proteinů obsahujících molekuly anti-CD32 a antigenu/alergenu. Alergeny jsou v tomto textu definovány jako antigeny, na které odpovídají atopičtí pacienti alergickými reakcemi. Vynález se také týká použití fúzního proteinu podle vynálezu v prevenci a/nebo léčbě alergií, včetně potravinových alergií, a způsobu léčby alergií, který obsahuje podávání pacientovi profylakticky nebo léčebně účinného množství fúzního proteinu podle vynálezu. Fúzní proteiny, jak jsou definovány výše, jsou vhodné pro použití jako farmaceutický, zejména antialergický přípravek.

# SEZNAM SEKVENCÍ

## (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

### (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 43 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: neznámá
- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iii) ANTI-SENSE: ne
- (v) TYP FRAGMENTU: vnitřní
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
- (A) ORGANISMUS: Dermatophagoides pteronyssinus

### (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ser | Cys | Arg | Arg | Pro | Asn | Ala | Gln | Arg | Phe | Gly | Ile | Ser | Asn | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Cys | Gln | Ile | Tyr | Pro | Pro | Asn | Ala | Asn | Lys | Ile | Arg | Glu | Ala | Leu | Ala |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gln | Pro | Gln | Arg | Tyr | Cys | Arg | His | Tyr | Trp | Thr |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     |     |     |

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 31 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: neznámá

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iii) ANTI-SENSE: ne

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: Dermatophagoides pteronyssinus

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ser | Cys | Arg | Arg | Pro | Asn | Ala | Gln | Arg | Phe | Gly | Ile | Ser | Asn | Tyr |
| 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 15  |     |
|     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |
| Cys | Gln | Ile | Tyr | Pro | Pro | Asn | Ala | Asn | Lys | Ile | Arg | Glu | Ala | Leu |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

# P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Fúzní protein obsahující

- a) jeden nebo více antigenů a
- b) jednu nebo více skupin interagujících s lidským receptorem Fcγ II (FcγRII) (CD32).

2. Fúzní protein podle nároku 1, ve kterém antigeny jsou alergeny atopické dermatitidy, alergického astmatu, alergické rýmy nebo alergické konjunktivitidy.

3. Fúzní protein podle nároku 1, který je tvořen z jednoho nebo více úseků DNA obsahujících T buněčný epitop spíše než z genů kompletních antigenů.

4. Fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, ve kterém skupiny interagující s FcγRII jsou lidské nebo humanizované protilátky aCD32 nebo části těchto protilátek, které stále specificky rozpoznávají a váží se k antigenu FcγRII (CD32).

5. Fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, ve kterém skupiny interagující s FcγRII jsou lidské nebo humanizované protilátky IgG nebo části těchto protilátek, které stále interagují s antigenem FcγRII (CD32).

6. Fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, ve kterém skupiny interagující s FcγRII jsou manipulované lidské nebo humanizované protilátky aCD32 nebo IgG nebo jejich části, které rozpoznávají FcγRII (CD32) s vyšší afinitou než nativní protilátky aCD32 nebo IgG.

7. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje fúzní protein podle nároku 1 spolu s alespoň jedním farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

8. Způsob přípravy fúzního proteinu podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že užívá techniku rekombinantních genů nebo chemické zesítnění.

9. Použití fúzního proteinu podle nároku 1 v prevenci a/nebo léčbě alergií (včetně potravinových alergií).

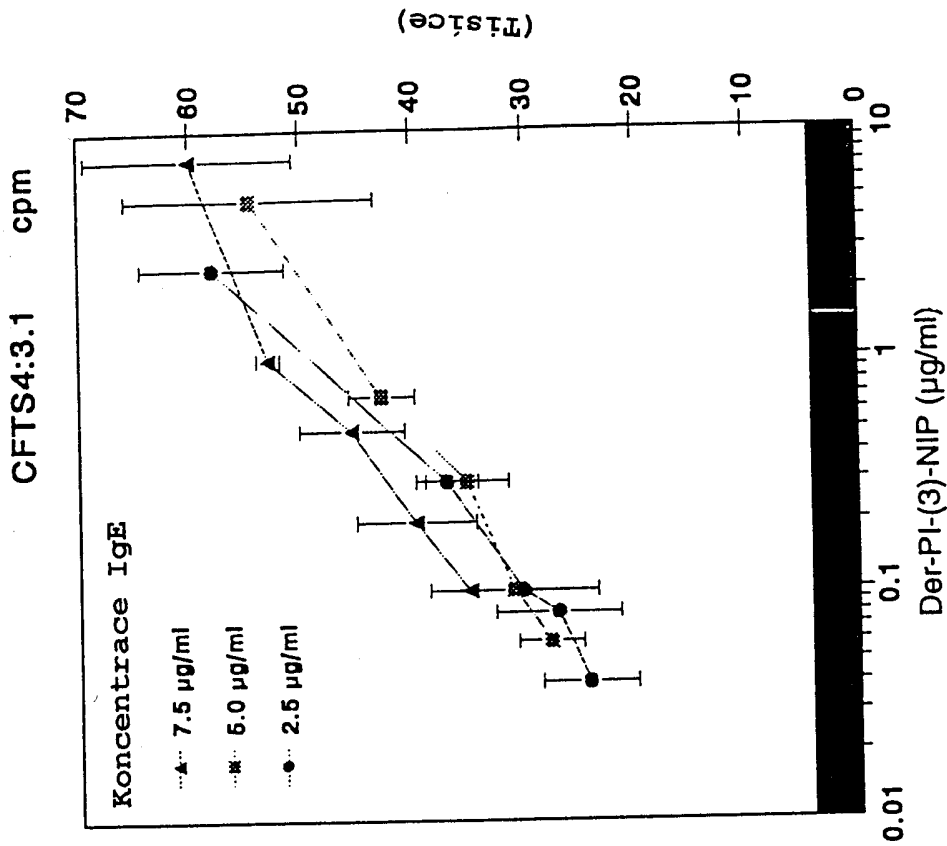
10. Použití fúzního proteinu podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro prevenci a/nebo léčbu alergií (včetně potravinových alergií).

11. Fúzní protein podle nároku 1 pro použití jako farmaceutický přípravek.

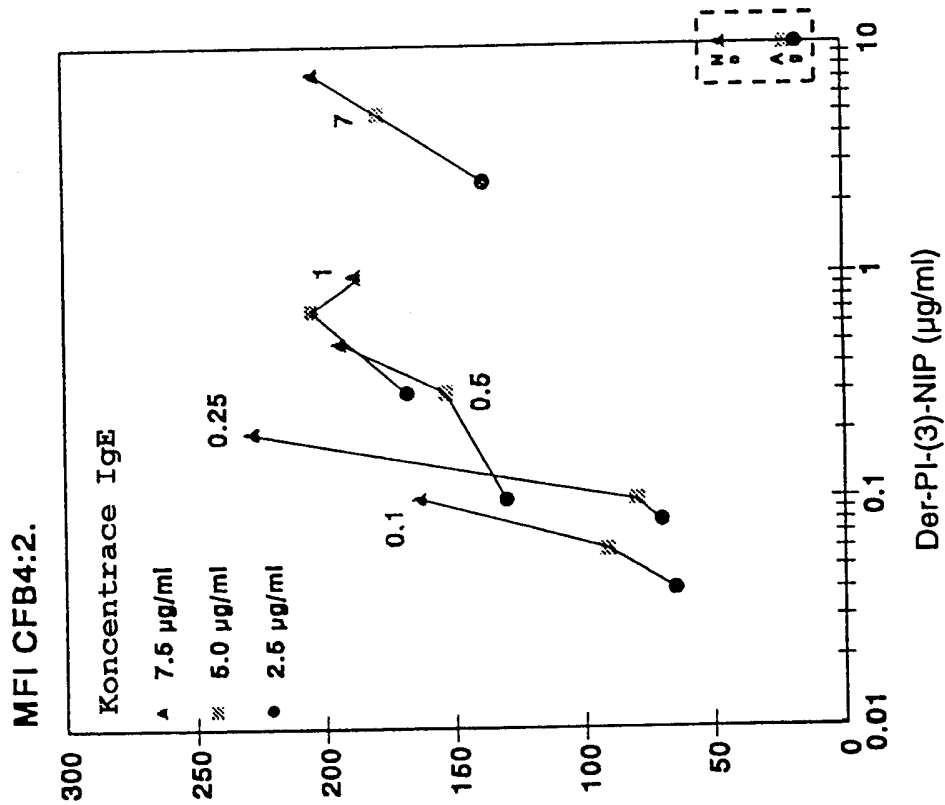
12. Způsob léčby alergií v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání pacientovi, potřebujícímu tuto léčbu, profylakticky nebo terapeuticky účinného množství fúzního proteinu podle nároku 1 spolu s alespoň jedním obvyklým farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

13. Způsob přípravy léčiva proti alergiím v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje smísení fúzního proteinu podle nároku 1 s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

Obr. 1

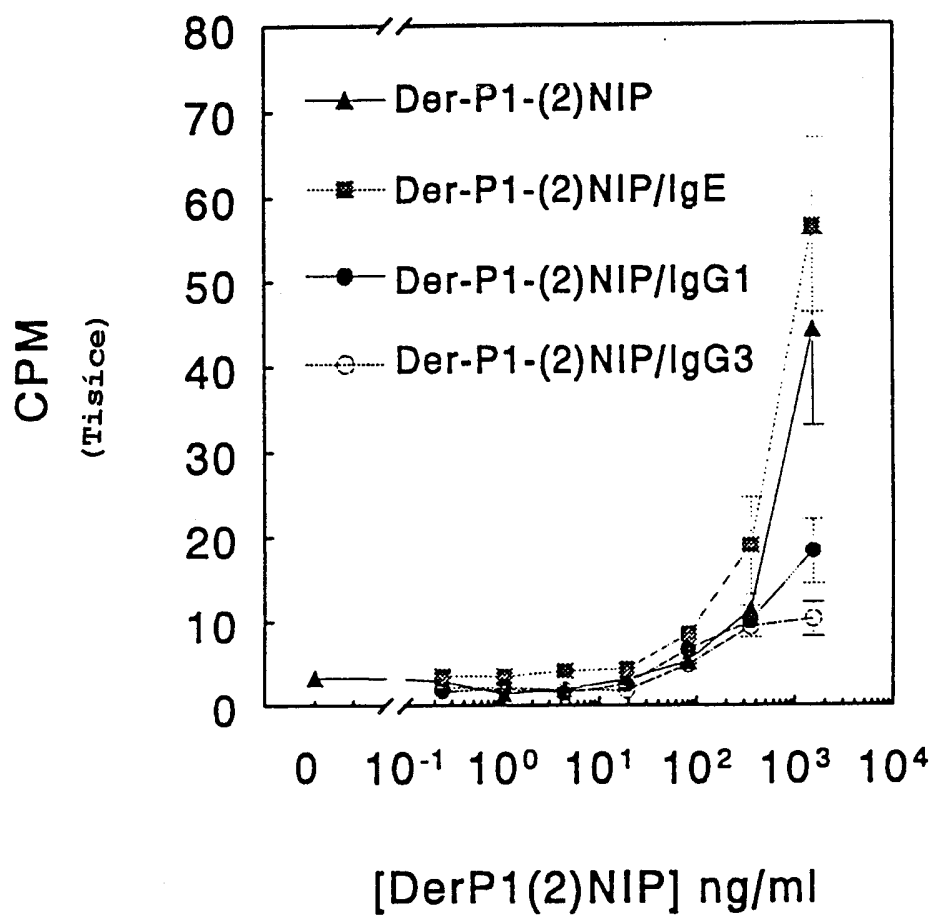


B

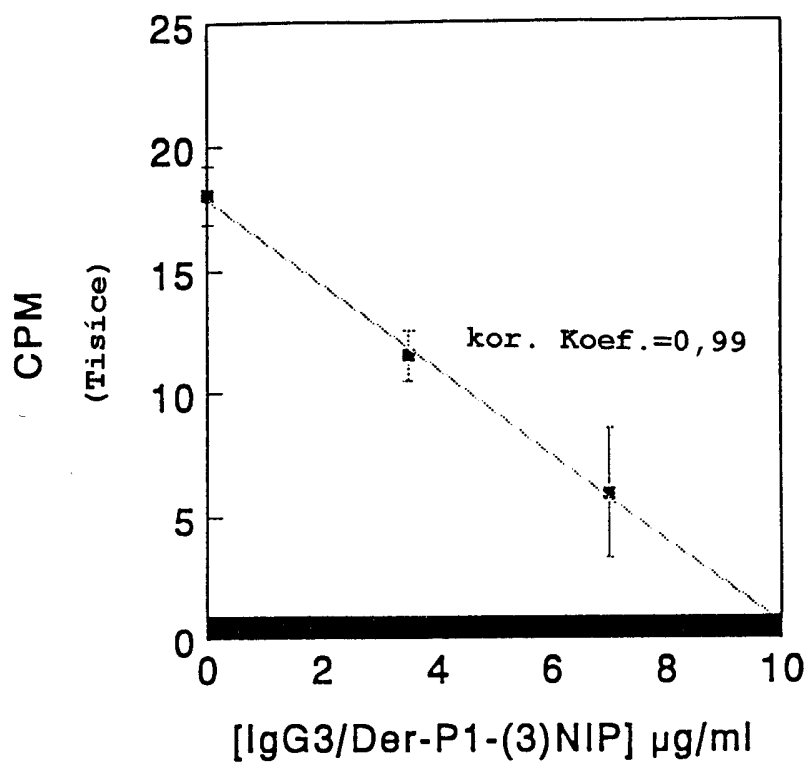


A

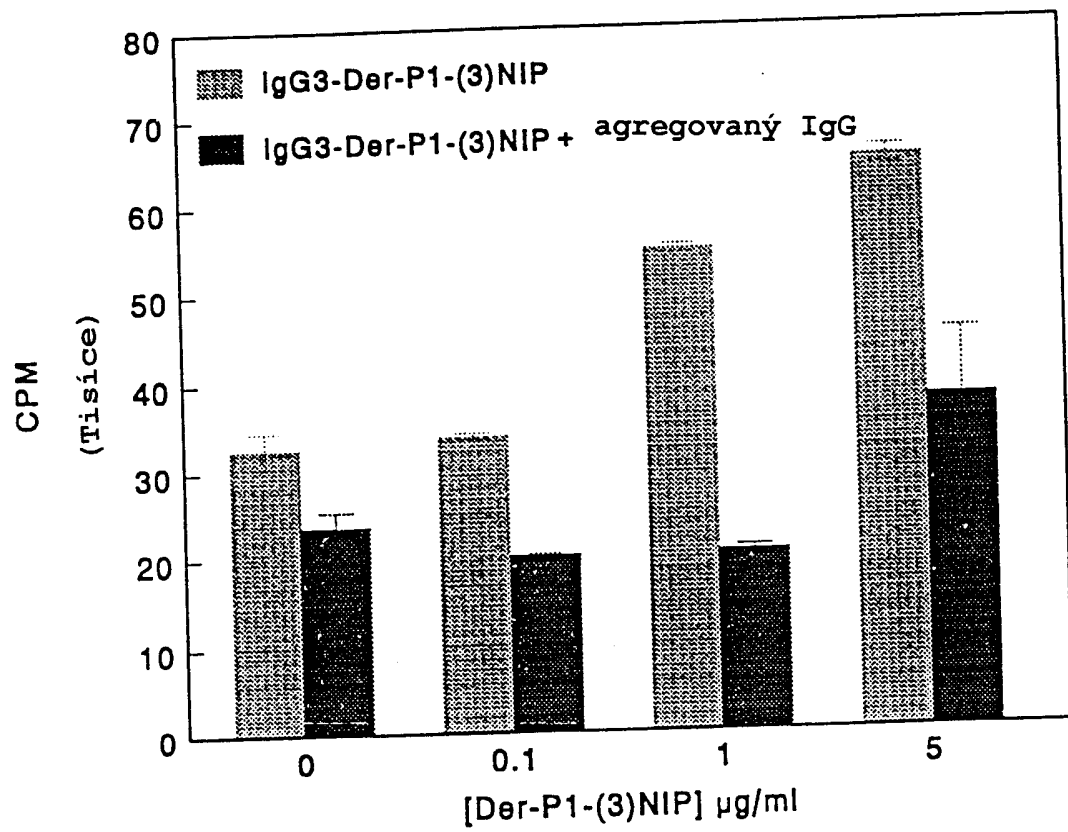
Obr. 2



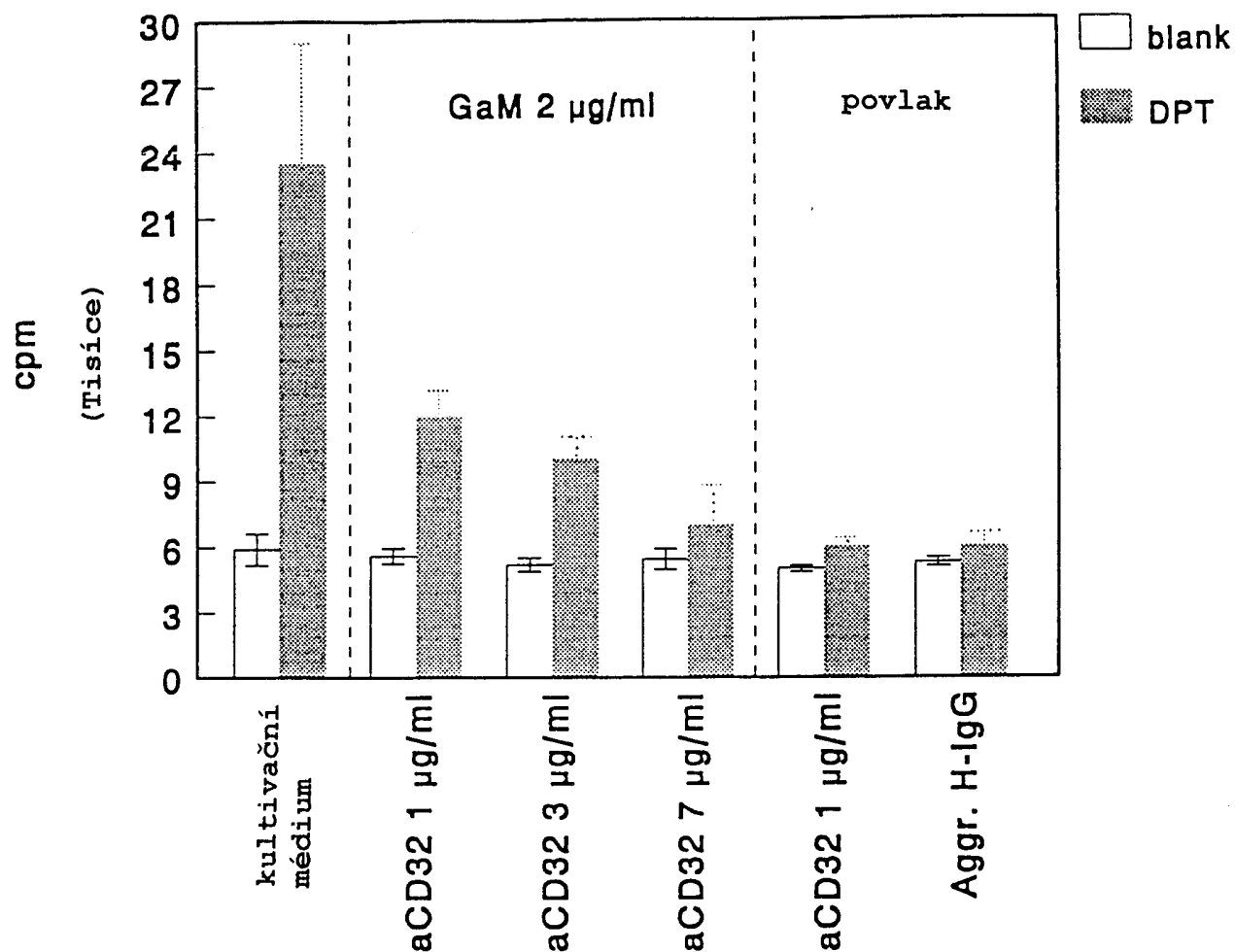
## Obr. 3

1  $\mu\text{g/ml}$  [Der P1]; 7  $\mu\text{g/ml}$  [IgE]

Obr. 4

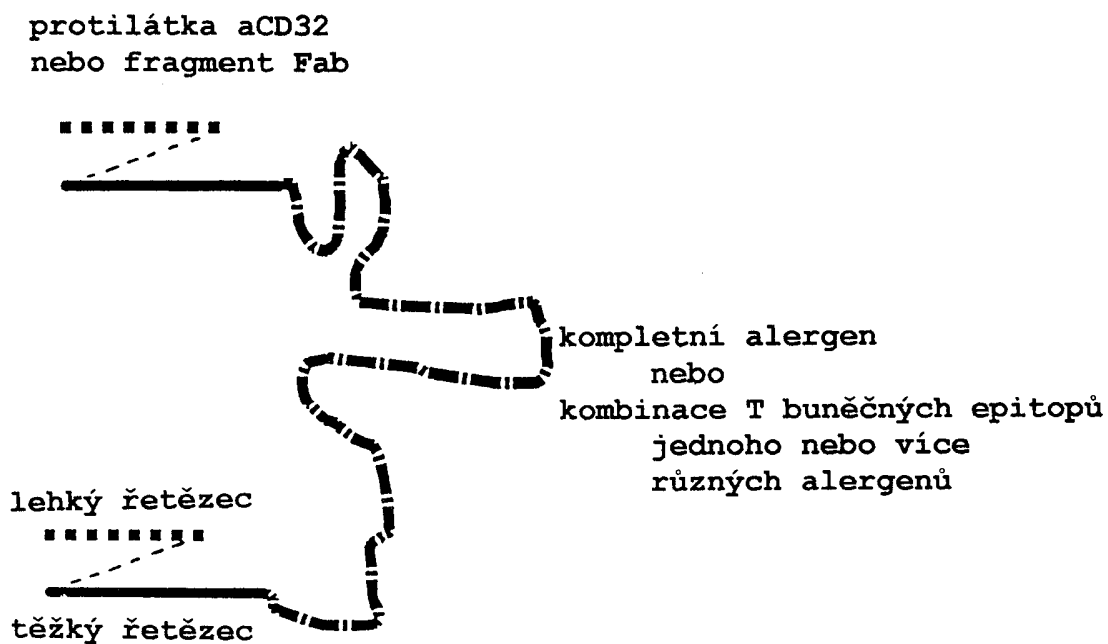


Obr. 5



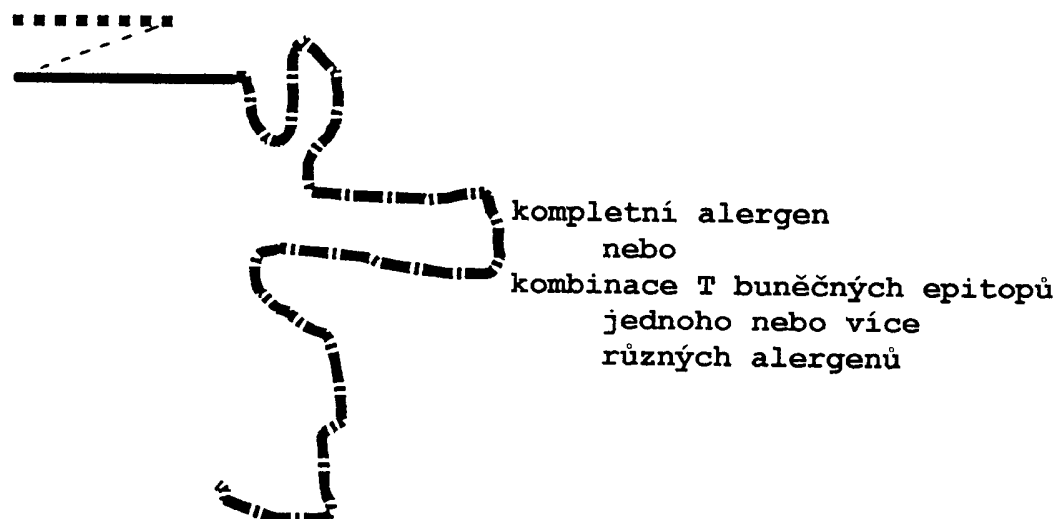
## Obr. 6

Fúzní protein skládající se z aCD32 Fab-alergen-aCD32 Fab

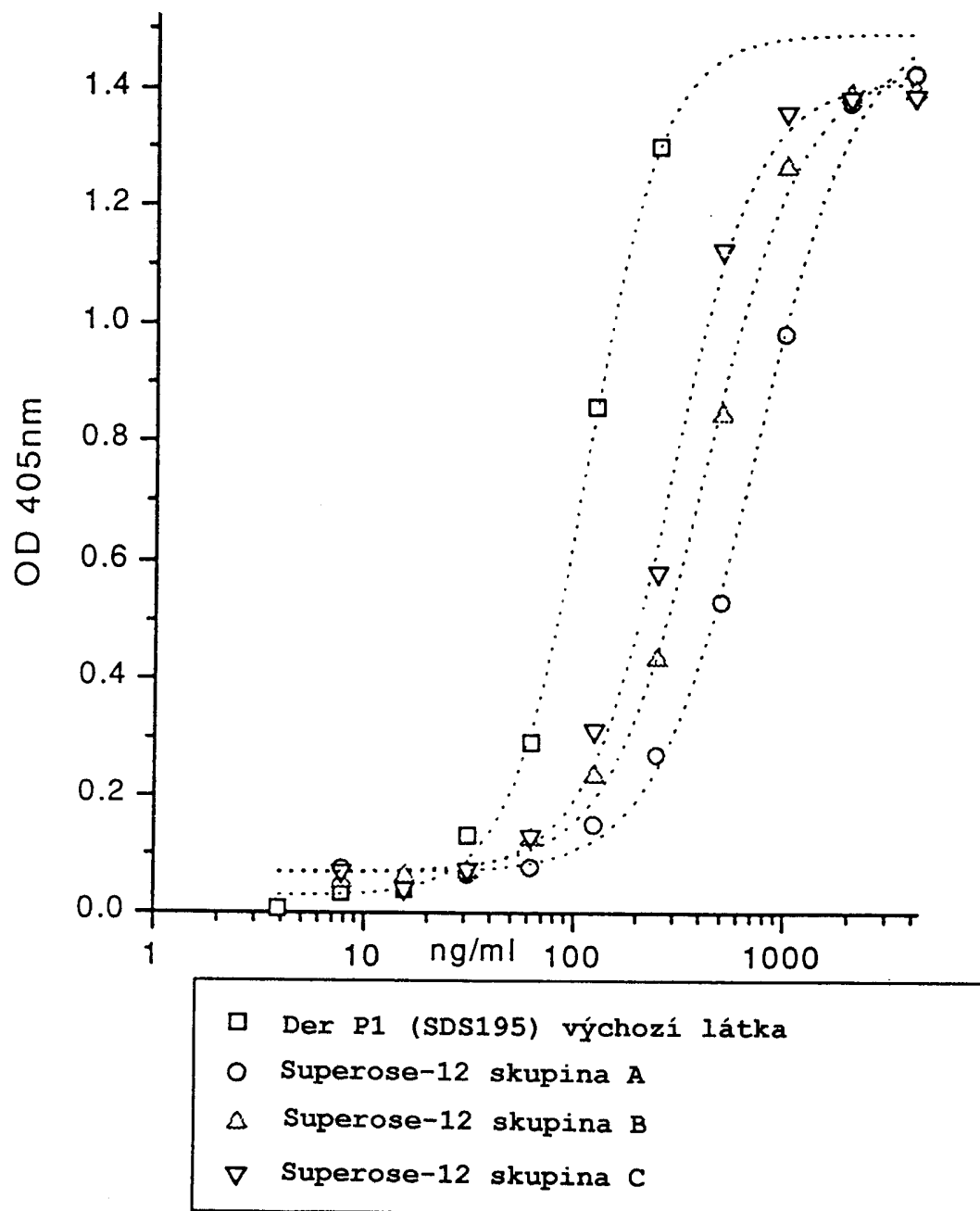


Fúzní protein skládající se z aCD32 Fab-alergen nebo alergen-aCD32 Fab

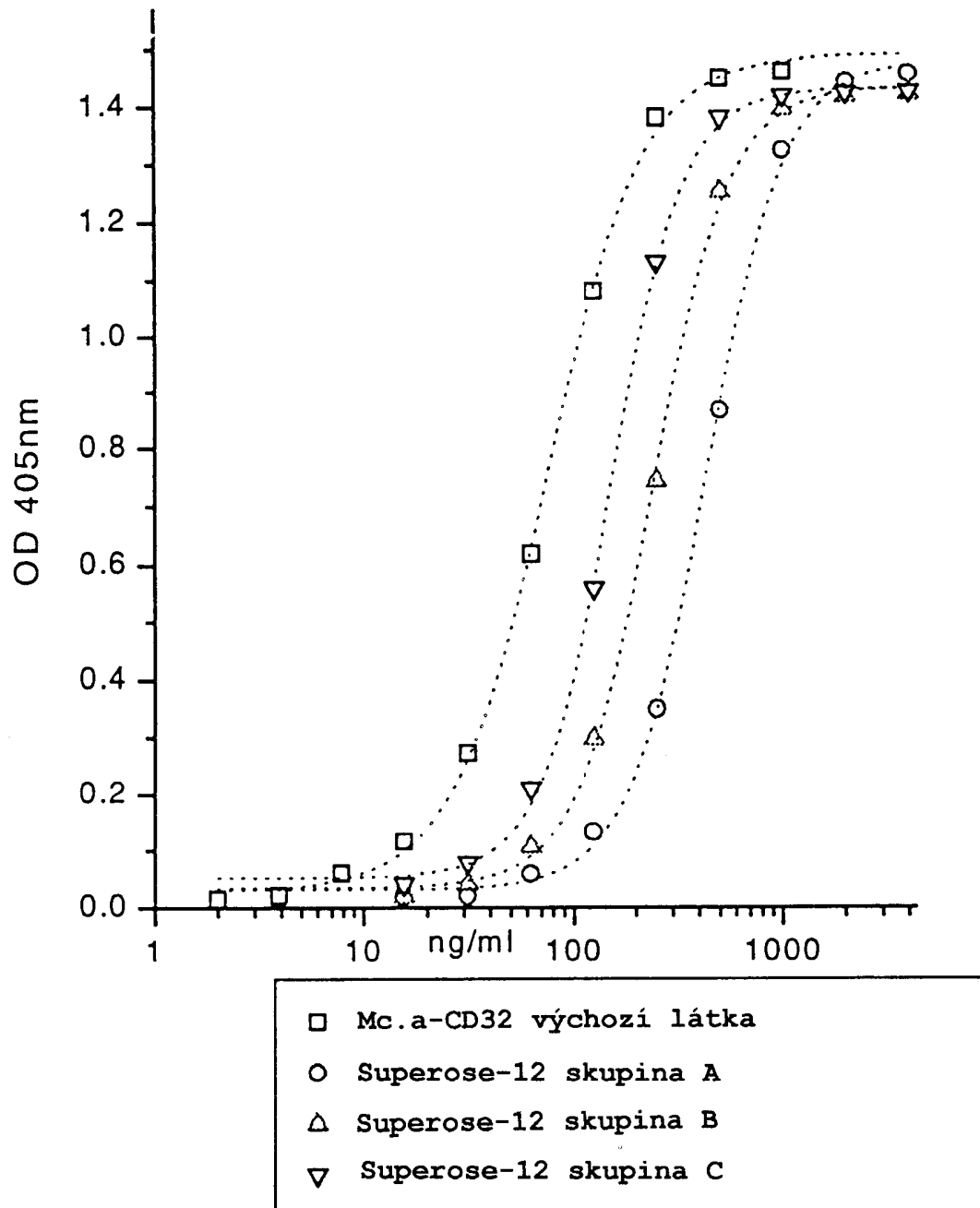
protilátka aCD32  
nebo fragment Fab



Obr. 7

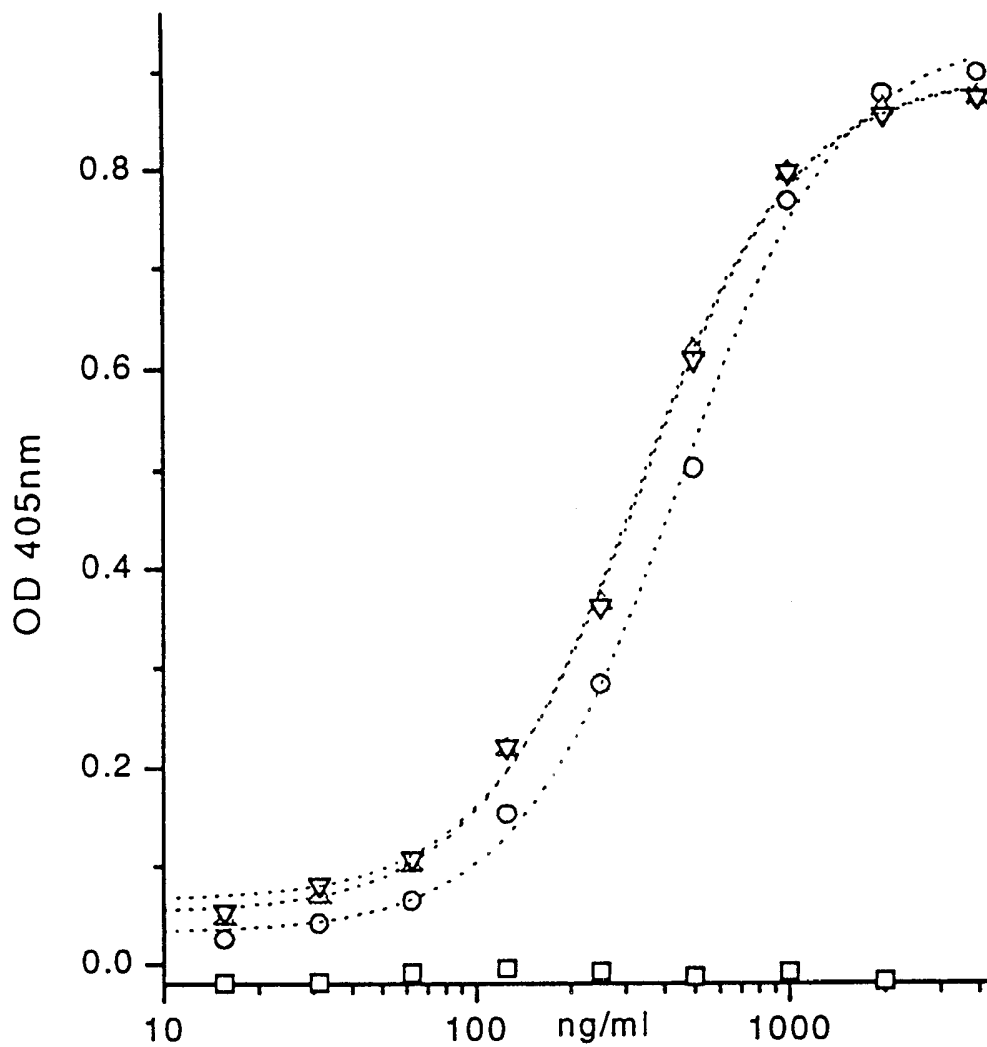


Obr. 8



## Obr. 9

Detekce: Pc.a-myšší IgG2b-alk. fosf.



□ Der P1 (SDS195) výchozí látka

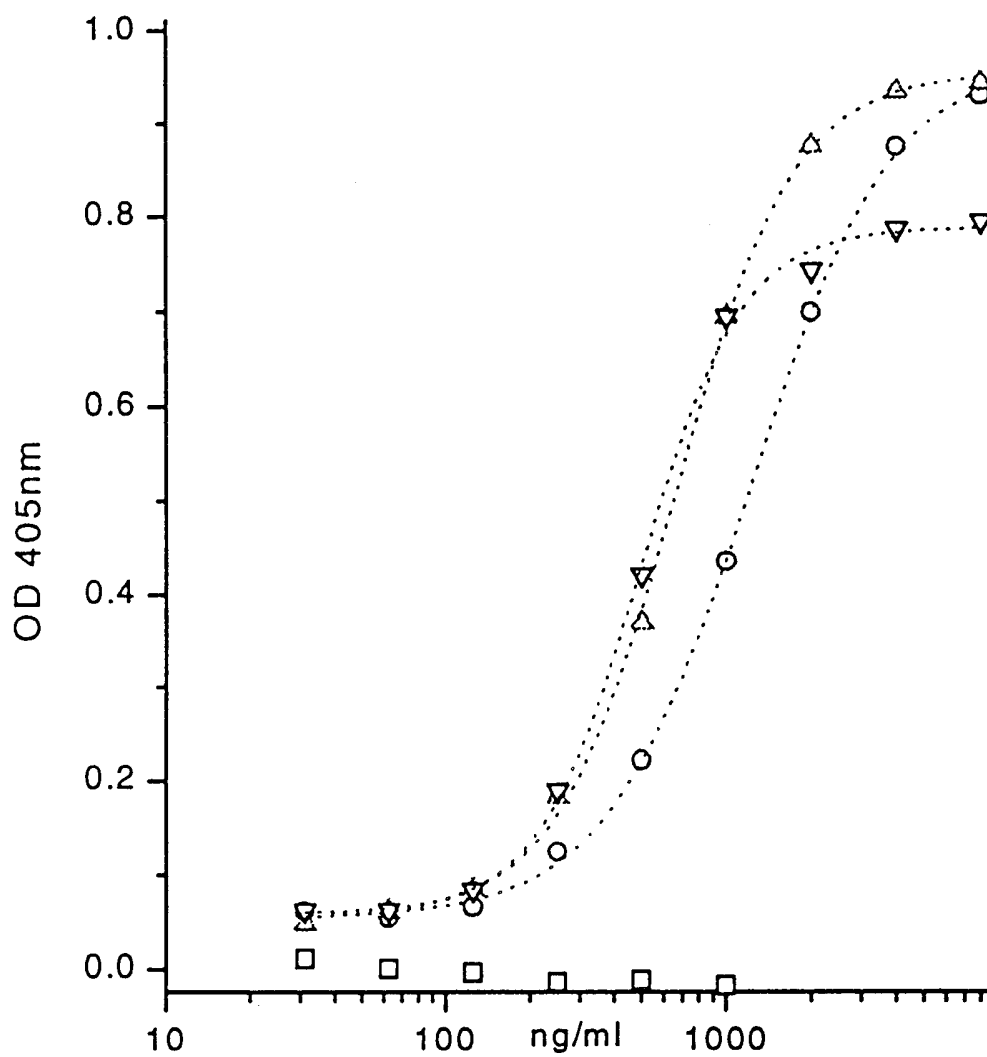
○ Superose-12 skupina A

△ Superose-12 skupina B

▽ Superose-12 skupina C

## Obr. 10

Detekce: Mc.a-Der P1-biotin



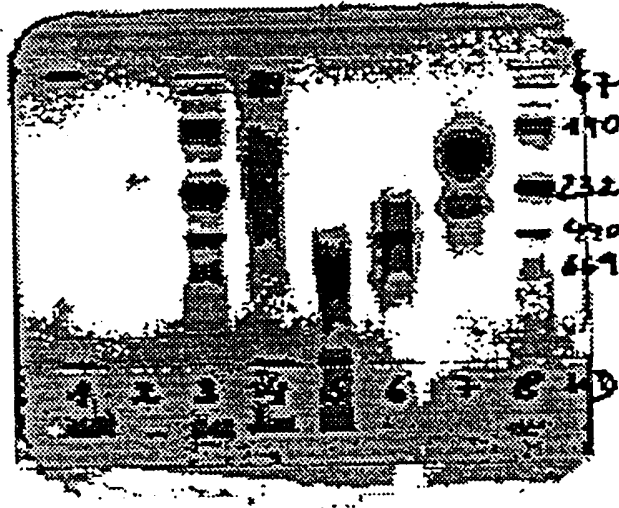
- Der P1 (SDS195) výchozí látka
- Superose-12 skupina A
- △ Superose-12 skupina B
- ▽ Superose-12 skupina C

11/16

PV 434-98

13.02.98

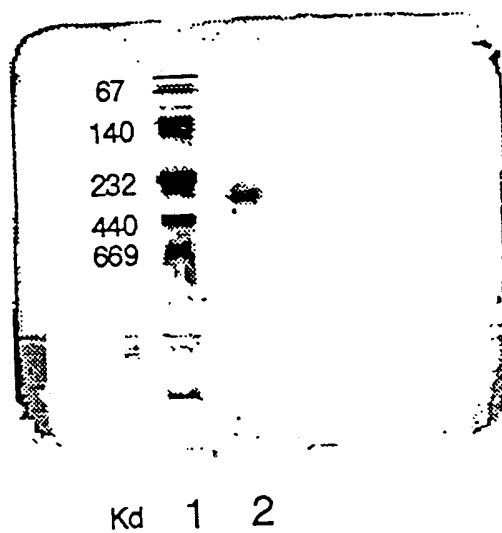
Obr. 11



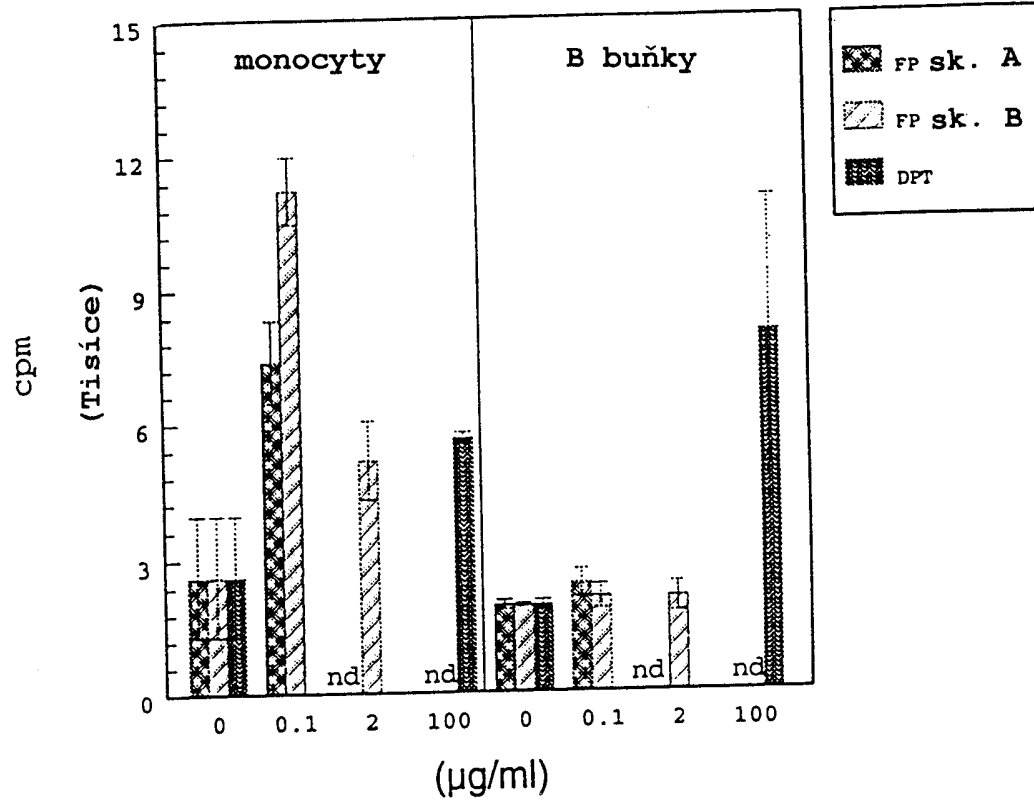
12/16

PV 439-98  
13.02.98

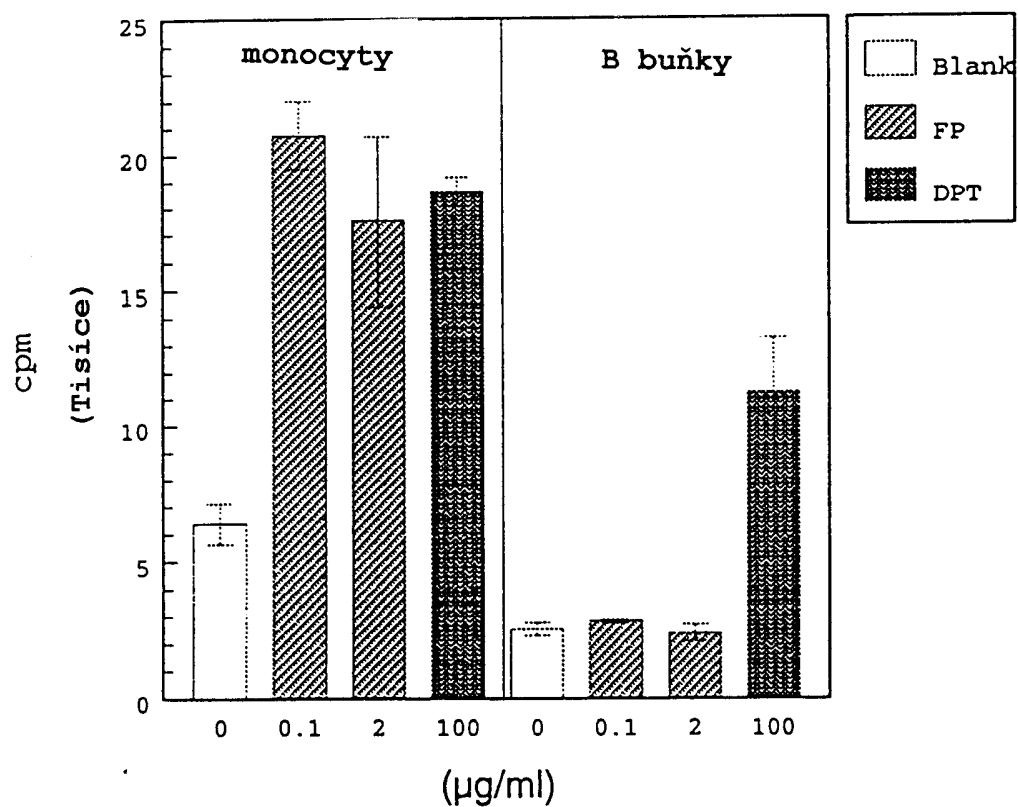
Obr. 12



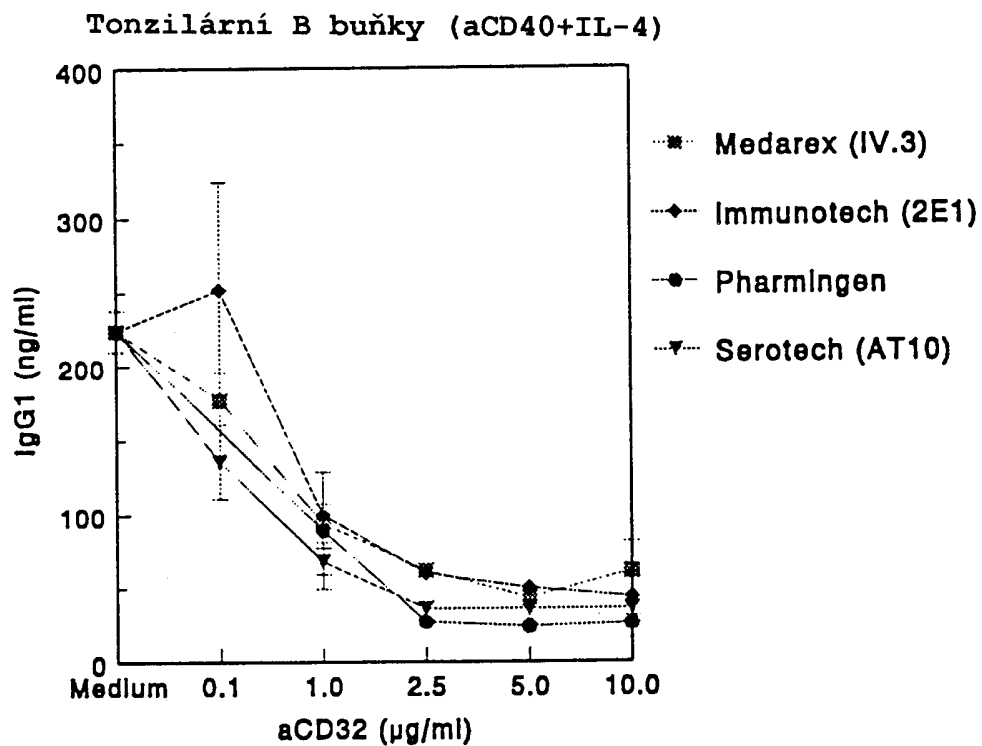
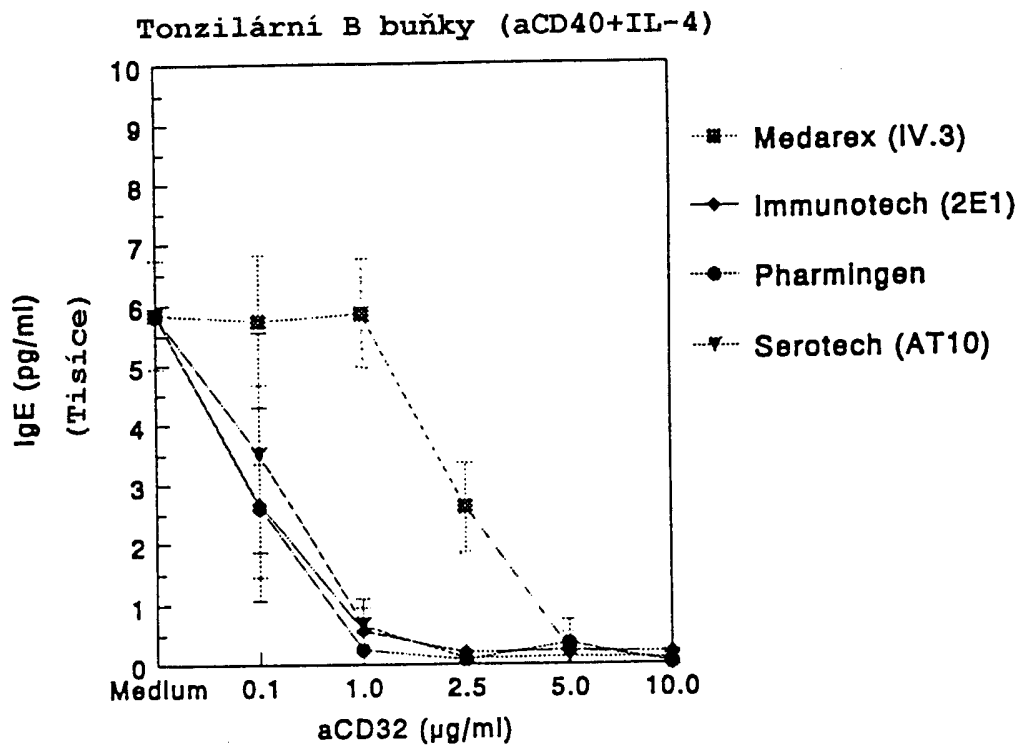
Obr. 13a



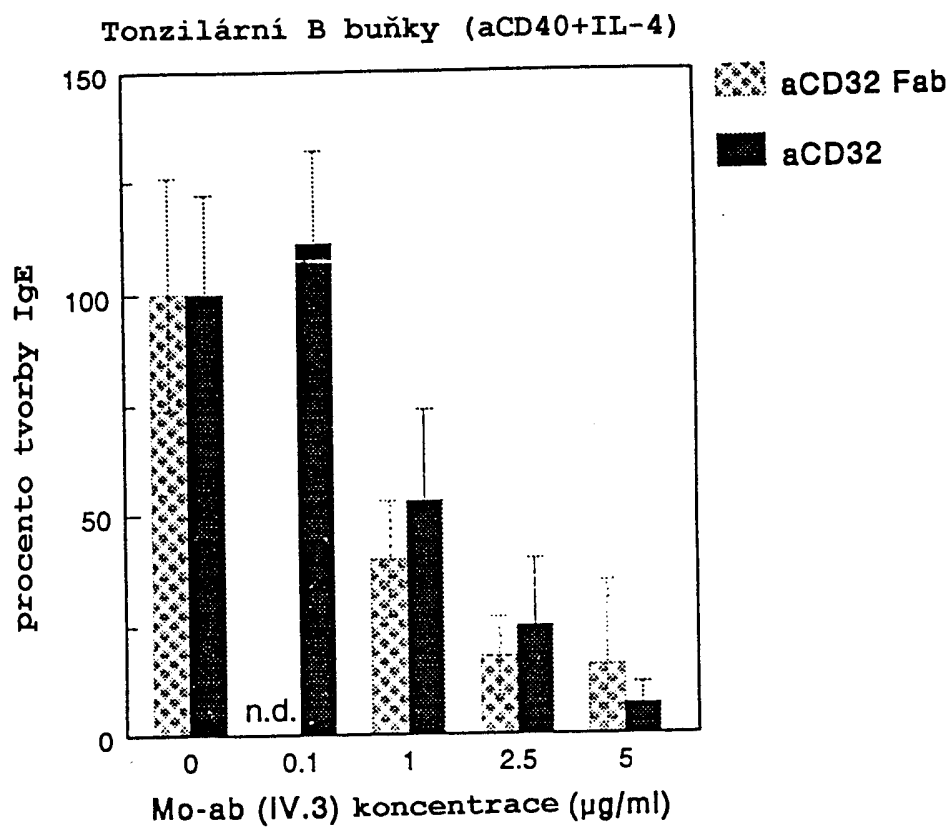
Obr. 13b



Obr. 14



Obr. 15



Obr. 16

