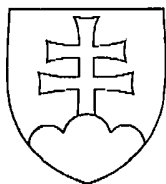


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

674-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07K 16/42

(22) Dátum podania: 23.05.96

(31) Číslo prioritnej prihlášky: EP95107967.2/0095209

(32) Dátum priority: 26.05.95

(33) Krajina priority: EP

(40) Dátum zverejnenia: 04.12.96

(86) Číslo PCT:

(71) Prihlasovateľ: MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BE-SCHRÄNKTER HAFTUNG, Darmstadt, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Carceller Ana, Darmstadt, DE;
Rosell Elisabet, Dr., Darmstadt, DE;
Gomez Alicia, Darmstadt, DE;
Adan Jaume, Darmstadt, DE;
Piulats Jaume, Dr., Darmstadt, DE;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktora, spôsob jej prípravy a farmaceutický prostriedok, ktorý ju obsahuje**

(57) Anotácia:
Monoklonálna anti-idiotypická protilátka, navádzajúca imunitnú odozvu proti nádorom a nesúca antigén receptora epidermálneho rastového faktora (EGFR), je protilátka odvodená od mAb 425 (ATCC HB 9629) alebo od jeho humanizovaného alebo chimerického derivátu a je účinnou látkou farmaceutického prostriedku proti nádorom.

Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru, spôsob jej prípravy a farmaceutický prostriedok, ktorý ju obsahuje

Oblasť techniky

Vynález sa týka anti-idiotypických protilátok, ktoré vyvolávajú imunitnú odozvu proti nádorom, ktoré nesú ako antigén receptor epidermálneho rastového faktoru (EGFR). Vynález sa týka predovšetkým anti-idiotypických protilátok, majúcich interný obraz antigénu a schopných simulovať externú oblasť ľudského EGFR. Ako výhodné podľa vynálezu, sa odvodzujú uvedené protilátky z myšieho mAb 425 alebo z jeho humanizovaných chimérnych verzií. Protilátky podľa vynálezu je možné použiť v nádorovej imunoterapii a imuno-profylaxii.

Doterajší stav techniky

V opise sa vyskytujú početné skratky a technické pojmy, ktoré majú nasledujúci význam:

"FRs" (Framework regions = úseky základnej štruktúry) znamená štyri podoblasti variabilných oblastí s ľahkým alebo ťažkým reťazcom, ktoré nesú tri CDR.

"CDRs" (complementarity determining regions = dopĺňujúce určujúce oblasti) znamená tri podoblasti variabilných oblastí s ľahkým alebo ťažkým reťazcom, ktoré majú hypervariabilné sekvencie a vytvárajú slučkové štruktúry, ktoré sú primárne zodpovedné za vytváranie priameho kontaktu s antigénom.

"EGF" a "EGFR" znamená epidermálny rastový faktor a jeho receptor.

"PCR" znamená polymerázovú reťazovú reakciu

"scFv" znamená Fv s jedným reťazcom, čo je protilátkový fragment.

"V_L" znamená variabilnú oblasť s ľahkým reťazcom.

"V_K" znamená kappa variabilnú oblasť s ľahkým reťazcom.

"V_H" znamená variabilnú oblasť s ťažkým reťazcom.

"Chimerické" alebo čiastočne humanizované protilátky sú protilátky majúce konštantné oblasti odvodené z ľudských zdrojov a variabilné oblasti (vrátane CDRs) pochádzajúce z neľudských zdrojov, napríklad z myší.

"Humanizované" alebo "plne humanizované" protilátky sú protilátky majúce konštantné oblasti a FRs odvodené z ľudských zdrojov, zatiaľ čo CDRs pochádzajú z neľudských zdrojov.

"Ab1" znamená prvú alebo materinskú protilátku, ktorá navádza kaskádu následných protilátok imunizáciou.

"Ab2" znamená typickú anti-idiotypickú protilátku ("anti-id"), ktorá je zameraná na idiotypy Ab1.

"Ab3" znamená anti-idiotypickú protilátku, ktorá je zameraná na idiotypy Ab2 a je preto porovnateľná s Ab1.

PBS znamená fosfátom tlmený roztok chloridu sodného.

FCS znamená telacie zárodočné sérum.

HBSS znamená Hanksov vyvážený solný roztok.

FITC znamená fluoresceínizotiokyanát

MTC znamená zmesovú bunečnú kultúru.

KLH znamená Keyhole Limpet hemocyanin.

MAB 425 je myšia monoklonálna protilátka zameraná proti dobre známej línii ľudských karcinómnych buniek A431 (ATCC CRL 1555), viaže sa na polypeptidový epitop externej oblasti ľudského EGFR a inhibuje väzbu EGF. Zistilo sa, že MAB 425 (ATCC HB 9629) sprostredkováva nádorovú cytotoxicitu in vitro a potlačuje in vitro rast nádorových buniek epidermálnych a bunečných radov odvodených od kolorektálneho karcinómu (Rodeck a kol., Cancer Res. 47, str. 3692, 1987). O humanizovaných a chimerických verziách MAB 425 sa pojednáva v patentovom spise číslo WO 92/15683.

Väzba EGF na receptor aktivuje početné biochemické procesy vedúce k replikácii DNA a deleniu buniek (Carpenter, G. Annu. Rev. Biochem. 56, str. 881, 1987). Systém EGFR bol nedávno implikovaný v onkogenickej transformácii buniek (DiFiore, P.P. a kol. Cell 51, str. 1063.10, 1987). Autokrinná stimulovaná proliferácia buniek bola navrhovaná u niekoľkých nádorov, ktoré expresujú EGFR a sekretujú EGF alebo TGF α (Ennis, B.W. a kol., Mol. Endo. 3, str. 1830, 1989), vyššia expresia EGFR v povrchu buniek bola zistená v nádoroch rôzneho tkanivového pôvodu ako pľúc, močového mechúra, v karcinómu, v melanómu a v neneuronálnych mozgových nádoroch (Neal, D.E. a kol., Lancet 1, str. 366, 1985; Libermann, T.A. a kol., Cancer Res. 44, str. 753, 1984; Herlyn, M. a kol., J. Clin. Immunol. 2, str. 135, 1982). EGFR je terapeutickým terčom, pretože je priamo implikovaný v bunečnej proliferácii početných tumorov. Ukázalo sa, že jeho nadexpresia má špatnú prognostickú hodnotu, pretože koreluje so zvýšeným invazívnym potenciálom (Sainsbury, J.R. a kol., Lancet 1, str. 364, 1985).

Pasívna alebo aktívna imunizácia proti EGFR u pacientov s rakovinou vedie k cirkulácii špecifických protilátok, ktoré pôsobia ako antagonisti EGF a TGF α , pretože blokujú ich prístup k receptoru a inhibujú rast nádoru. EGFR je dobrým kandidátom pre idiotypovú vakcínu, pretože bol vyčistený z nádorových buniek. Nie je však dostupný v dostatočnom množstve pre terapeutické účely.

CFA znamená úplné Freundové adjuvanty.

HRPO znamená ľudskú rekombinantnú peroxidázu.

Anti-idiotypické protilátky (anti-idotypy alebo "anti-idy") sú protilátky zamerané proti epitopom (nazývaným idiotyp), umiestneným v antigénovej väzbovej oblasti alebo vo variabilnej oblasti inej protilátkovej molekuly. Interakcia medzi idiotypmi (Ab1) a anti-idiotypmi (Ab2) hrajú významnú úlohu v uchovaní imunitnej homeostázy. Sieťovanie idiotypov a anti-idiotypov malo vysvetliť imunoreguláciu (Jerme, F.G., Ann. Immunol. 125C, str. 373, 1974). "Interný obraz" anti-idiotypických protilátok simuluje trojrozmernú štruktúru antigénu rozpoznanú Ab1. Podávanie Ab2 môže vyvolať produkciu protilátok Ab3 proti pôvodnému antigénu. Pri niektorých prenosných ochoreniach a pri liečbe rakoviny boli aplikované s úspechom idiotypové vakcíny. (Napríklad: Uytdehaag, F.G. a C. M. H. Osterhaus, J. Immunol. 134, str. 1225, 1986; Kennedy, R.C. a kol., Science 232, str. 220, 1986; Hiernaux, J. R., 56, str. 1407, 1988; Stein, K.E. a T. Soderstrom J. Exp. Med. 160, str. 1001, 1984). V nádorovej imunológii bola použitá idiotypická vakcinácia k modulovaniu rastu nádorov v experimentálnych systémoch in vivo a in vitro. (Smorodinsky, N. I. a kol., Eur. J. Immunol. 18, str. 1713, 1988 a Viale, G. a kol. J. Immunol. 139, str. 4250, 1987). Herlyn a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, str. 1438, 1987) uvádzajú sľubné výsledky v klinických pokusoch na pacientoch s pokročilou kolorektálnou rakovinou, zastavenie metastáz a čiastočná klinická remisia bola pozorovaná u pacientov ošetrovaných len anti-idmi. Anti-idiotypické protilátky a ich použitie v nádorovej terapii sú tiež známe napríklad z US patentového spisu číslo 4 918164 a z EP 0141783.

Epidermálny rastový faktor (EGF) je polypeptidový hormón, ktorý je mitogenický pre epidermálne a epiteliálne bunky. V prípade, že dôjde k interakcii EGF s citlivými bunkami, viaže sa na membránové receptory (EGFR). EGFR je transmembránový glykoproteín približne 170 kD a je génovým produktom c-erb-B proto-onkogénu.

Početné skupiny vedcov skúmali anti-idiotypické protilátky a ich štrukturálne porovnanie s ich antigénmi a internými obrazcami (napríklad Tsjisaki a kol., J. Immunol. 150, str. 508, 1993; Raychaudhuri a kol., J. Immunol. 145, str. 760, 1990; Bruck a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, str. 6578, 1986).

Podstata vynálezu

- Podstatou vynálezu je monoklonálna anti-idiotypická protilátka vyvolávajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru (EGFR).

- Predovšetkým sa vynález týka nových anti-idiotypických protilátok (anti-idov), ktoré vyvolávajú imunitnú odozvu voči receptoru epidermálneho rastového faktoru. Vynález poskytuje obzvlášť najmenej dva také anti-idy (označené 5A6 a 3B6), ktoré simulujú antigénové miesto na povrchu ľudského epidermálneho receptora rastového faktoru. Protilátky podľa vynálezu, najmä protilátky schopné simulovať EGFR, sa preto môžu použiť na vyvolanie a naraštievanie imunitnej odozvy voči všetkým druhom ľudských nádorov, ktoré expresujú receptor epidermálneho rastového faktoru na svojom povrchu, vrátane melanómov, gliómov a karcinómov. Uvedené protilátky sa dajú použiť tiež k diagnostickým účelom, kde ide o lokalizáciu a posúdenie uvedených nádorov in vitro alebo in vivo.

Podstatou vynálezu je preto zaistenie novej protilátky, ktorou je monoklonálna anti-idiotypická protilátka (Ab2), vyvolávajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru (EGFR).

V detaile sa vynález týka monoklonálnej anti-idiotypickej protilátky simulujúcej interný obraz antigénu EGFR poznávaného zodpovedajúcou myšou, humanizovanou alebo chimerickou monoklonálnou idiotypickou protilátkou (Ab1). Táto protilátka Ab1 môže byť neľudská, osobitne myšia, humanizovaná alebo chimerická monoklo-

nálna protilátka, ako je to hore uvedené. Pretože je možné si predstaviť, že je niekoľko protilátok Abl zameraných proti epítoku AGFR, týka sa vynález tiež anti-idiotypických protilátok, ktoré môžu rozpoznať túto skupinu Abl protilátok anti-EGFR.

Vynález sa ďalej týka monoklonálnych anti-idiotypických protilátok anti-EGFR, ktoré je možné získať zo zodpovedajúcej protilátky Abl-anti-EGFR, napríklad imunizáciou.

Preto je podstatou vynálezu monoklonálna anti-idiotypická protilátka, ktorú je možné získať imunizáciou zvierata so zodpovedajúcou myšou, humanizovanou alebo chimerickou monoklonálnou idiotypickou protilátkou (Abl).

Anti-idiotypické protilátky podľa vynálezu sa s výhodou získajú imunizáciou monoklonálnou anti-EGFR protilátkou 425 alebo jej humanizovanými a chimerickými verziami. MAb 425 sa vyrába známym bunčným radom deponovaným pod označením ATCC HB 9629.

Podstatou vynálezu je preto monoklonálna protilátka, ktorá sa vyznačuje tým, že idiotypickou protilátkou (Abl) je MAb 425 (ATCC HB 9629) alebo je od nej odvodená humanizáciou alebo chimerizáciou známymi spôsobmi, napríklad opísanými v patentovom spise číslo WO 92/15683.

Vynález sa tiež týka špecifických anti-idiotypických protilátok, ktoré majú dobre definované aminokyselinové sekvencie v hypervariabilnej (CDR) a variabilnej (FR) oblasti protilátok a ktoré sú vyznačené na obr. 5A až F.

Vynález sa teda tiež týka anti-idiotypickej monoklonálnej protilátky, pričom oblasti CDR a FR uvedené protilátky zahŕňajú aminokyselinové sekvencie podľa obr. 5A až F. Okrem toho je podstatou vynálezu podľa výhodného rozpracovania anti-idiotypická protilátka majúca aminokyselinovú alebo nukleotidovú sekvenciu podľa obr. 5 A až F.

Sekvencie podľa vynálezu zahŕňajú tiež varianty a obmeny pochádzajúce z presne definovaných sekvencií podľa obr. 5 spontánnych alebo chemicky vyvolaných alebo fyzikálne spôsobených mutácií, inzercií, vypustením a náhradou jednotlivých aminokyselinových alebo nukleotidových zvyškov, za predpokladu, že sa biologická aktivita a vlastnosti konečných protilátok podstatne nezmenili.

Pojem anti-idiotypická protilátka tiež zahŕňa fragmenty takých protilátok, ako sú napríklad molekuly Fv s jedným reťazcom alebo molekuly F(ab)'₂ a Fab', ktoré sú v odbore dobre známe (Skerra a Plücker, Science 240, str. 1038, 1988; Better a kol. Science 240, str. 1041, 1988). Opísané boli tiež Fv s jedným reťazcom (kde V_L a V_H reťazce sú spolu viazané) (napríklad Bird a kol., Science 242, str. 423, 1988; Houston a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, str. 5879, 1988).

Spôsob prípravy monoklonálnej anti-idiotypickej protilátky, navádzajúcej imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru, spočíva podľa vynálezu v tom, že sa zvieru imunizuje zodpovedajúcou idiotypickou protilátkou (Ab1), ktorá sa viaže na idiotypický antigén priamo svojimi CDR oblasťami, syntetizovaná antiidiotypická protilátka, ktorá sa viaže na idiotypy maternickej protilátky Ab1, sa oddelí a čistí sa známymi spôsobmi.

Vynález sa tiež týka farmaceutického prostriedku obsahujúceho ako účinnú látku monoklonálnu anti-idiotypickú, hore definovanú protilátku a prípadne farmaceuticky prijateľný nosič.

Konečne sa vynález týka použitia uvedenej anti-idiotypickej protilátky pre výrobu drôg zameraných proti nádorom.

Vynález opisuje získanie troch monoklonálnych anti-idiotypických protilátok (5A6, 3B6 a 15H8), ktoré rozpoznávajú idiotypy prekrývajúce sa s antigénovým väzbovým miestom (paratopom) mAb 425. Sérologické a imunologické štúdie ukazujú, že 5A6 a 3B6 nesú

interný obrazec epitopu rozpoznaného mAb 425 vyvolávajúcím humorálnu odozvu v syngenickom (Balb/c myšom) a v alogenickom (B6D2F1 myšom) systéme. Pravý interný obrazec Anti-idov bude pôsobiť ako náhražka antigénu v zvieratách iných druhov, avšak tieto Anti-idy boli neúčinné pri vyvolaní odozvy podobnej Ab1 v prípade králikov a potkanov. Klonovanie a sekvenovanie ich V-oblastí ukázalo existenciu aminokyselinových homológií medzi CDR s ľahkými i ťažkými reťazcami a niektoré zvyšky EGFR umiestnené v ligandovej väzbovej oblasti, čo naznačuje antigénové napodobenie. Štúdiá antigenicity homologických oblastí naznačuje možné vysvetlenie nedostatku biologického pôsobenia v heterogénnom systéme a podporuje potenciálnu účinnosť v ľudskej terapii.

Opis obrázkov a tabuliek

Obr. 1: Inhibičné väzby 425 na EGFR prostredníctvom 5A6, 3B6 a 15H8 alebo neodvodených mAb. Percento inhibície je vypočítané tak, ako je to opísané v materiáli a spôsoboch používajúcich hodnoty OD z ELISA.

Obr. 2: Krivky inhibičnej väzby myši (A) a humanizovaná verzia (B) 425 na EGFR expresujúca bunky A431 prostredníctvom 5A6 (bodka), 3B6 (koliesko), 15H8 (prázdny trojuholník) a myši IgG1 (Sigma - plný trojuholník). Výsledky sú vyjadrené ako priemer OD duplicitných vzoriek, osa x: prírastok ($\mu\text{g}(\text{ml})$), osa y: OD.

Obr. 3: Konkurenčná ELISA pre väzbu Ab3-Ab2. Radové riedenie séra Ab3 potkana je testované na väzbu pevnou fázou potiahnutej Ab2 alebo neodvodenej mAb15 inkubovanej vopred 5A6 (bodka), 3B6 (plný štvorec), 15H8 (plný trojuholník). Ako kontrola bol použitý mAb15 (prázdny trojuholník) a normálne myšie sérum (plný kosoštvorec). A: Ab3 séra anti-5A6 potkanov; B: Ab3 séra anti-3B6 potkanov; Ab3 séra anti-15H8 potkanov; D: kontrolný anti-mAb15 potkanov; osa y: OD, osa x: zriedenie sér $\times 10^{-3}$.

Obr. 4: ELISA pevnej fázy: Inhibičná väzba Balb/c a B6D2F1 Ab3 od 5A6 a 2B6 imunizovaných myší na čistené EGFR Anti-idy.

Obr. 5: Úplná sekvencia variabilnej oblasti (vrátane vodcovskej sekvencie) myších monoklonálnych protilátok 15H8, 5A6 a 3B6 s ťažkým a ľahkým reťazcom. Znázornené sú nukleotidové a amonokyselínové sekvencie. Vodcovské sekvencie, pokiaľ sú zaznamenané, sú vytlačené tučne, sekvencie CDR sú vytlačené kurzívou a sekvencie primerov, použitých na zosilnenie variabilných oblastí, sú podčiarknuté. Ťažký reťazec 15H8, 5A6 a 3B6 má charakteristickú štruktúru skupiny IIID. Ľahké reťazce 15H8 a 5A6 majú charakteristickú štruktúru kapa-skupiny V a 3B6 má štruktúru kapa-skupiny III, všetko podľa Kabatovej klasifikácie.

A: 15H8 ťažký reťazec

B: 15H8 ľahký reťazec

C: 3B6 ťažký reťazec

D: 3B6 ľahký reťazec

E: 5A6 ťažký reťazec

F: 5A6 ľahký reťazec

Obr. 6: Porovnané sekvencie CDR2H, CDR3H a CDR2L externé oblasti Ab2 a EGFR. Identické aminokyseliny sú znázornené v uzavretých rámečkoch. Otvorené rámečky znamenajú podobné aminokyseliny. Potenciálne antigénové oblasti sú v šrafovaných poliach.

Tabuľka I. Konštanty afinity 5A6, 3B6 a 15H8 voči 425. Disociačné konštanty sú vypočítané z náčrtkov väzby Ab2 na 425 z hodnôt OD získaných pomocou ELISA vykonanou opísaným spôsobom.

Tabuľka II. Inhibičná väzba Ab1-Ab2 prostredníctvom Ab3 a detekcia vzájomne reagujúcich idiotypov Ab2. Dvojnásobné zriedenie séra Ab3 od myší (A), králikov (B) a potkanov (C) imunizovaných Anti-idmi alebo neodvodenými mAb sú testované na inhibíciu väzby ich imunizujúcich Ab2, ostatné Anti-idy a myší izotyp a alotyp súhlasí s mAb. Uvedené sú sérové titre vykazujúce 100% inhibíciu.

Tabuľka III. Odozva anti-EGFR v Balb/c myších stanovená nepriamou imunofluorescenciou voči EGFR pozitívnym (A431) alebo negatívnym

nefixovaným bunkám (C33A), ELISA proti úplným bunkám alebo vyčistenej externej oblasti.

- a) Detekcia FITC králičí Anti-myší IgM+IgG
- b) Detekcia FITC králičí Anti-myší IgG
- c) Pozitívne zvieratá/imunizované zvieratá

Vynález bližšie objasňuje nasledujúci podrobný opis.

Biologický materiál a všeobecné metódy

Mikroorganizmy, bunečné línie, plazmidy, fágemidy, promotóry, rezistentné markéry, replikačné počiatky alebo iné fragmenty vektorov, ktoré sú tu používané, sú obchodne alebo inak všeobecne dostupné. Pokiaľ to nie je v prihláške uvedené inak, sú použité len ako príklady a nie sú nezbytné podľa vynálezu a môžu byť nahradené inými vhodnými nástrojmi a biologickými materiálmi.

Techniky, potrebné podľa vynálezu, sú tu podrobne opísané. Ostatné podrobne neopísané techniky sú známe ako štandardné spôsoby, známe pracovníkom v odbore, alebo sú podrobne opísané v citovaných odkazoch, v patentovej literatúre a v štandardnej literatúre (napríklad Harlow, E. a D. Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.).

K pokusom in vivo boli použité myši Balb/c (IFFA CREDO), hybridného kmeňa B6D2F1 od myší C57BL/6J a DBA/2J (IFFA CREDO), potkany Wistar (Interfauna Ibérica) a novozélandské biele králiky (Biocentre).

A431 je epidermálny karcinóm (ATCC CRL1555) expresujúci EGFR. C33A (ATCC HTB31), mozgový karcinóm, je receptor-negatívny. Ako fúzny partner pre získanie hybridomu je použitý HL1-Friendly Myeloma-653 (Ventrex, Bioventures Group). Všetky línie sa kultivujú v médiu RPMI 1640 doplnenom 10 % zárodočného telacieho séra a 2mM glutamínu.

Anti-EGFR mAb 425 (Ab1) je generovaný podľa Rodecka a kol. Ako kontroly sú použité viaceré myšie mAb neodvozených špecifít v rôznych skúškach: mab 15 (IgG1,k), anti-gp85/45 karcinómu malých pľúcnych buniek; R24, (IgG3,k), anti-GD3; 14F9 (IgG3,k), anti-GD3 a Me361(IgG2a), anti-GD2 boli opísané (Kamma H. a kol., Cancer Res. 49(8), str. 5118, 1989; Dippold, W. G. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, str. 6114, 1980; Massó O. a kol., Immunologia 10 str. 36, 1991 a Thurin J. a kol., Cancer Res. 46, str. 1229, 1987).

F111 (IgG1,k) bol získaný PEG vyvolanou fúziou medzi splenocytmi z RNázou imunizovaných myší Balb/c a Friendly-Myeloma ako je to ďalej opísané.

Získanie Anti-425 idiotypu mAb

Pomocou splenocytov z myší Balb/c imunizovaných mAb 425 sa generujú myšie hybridomy a fúzujú sa s bunkami 653 Friendly-Myelomu. Supernatanty sa testujú sendvičovou ELISA proti mAb 425. Hybridómy 5A6, 3B6 a 15H8 sa získajú z dvoch fúzií, ktoré dajú 2,8% a 10,5% špecifickej účinnosti. Po trojnásobnom klonovaní spôsobom obmedzeného riedenia bolo zistené, že sa jedná o IgG1,k.

Charakterizácia 5A6, 3B6 a 15H8

Na charakterizovanie Ab2 sa použijú surové supernatanty alebo čistené vzorky proteínu A. Anti-idová povaha sa potvrdí ich špecifickou väzbou na mAb 425 pri testovaní oproti panelu neodvođených mAb rôznymi antigenickými špecifitami (111, 361 15 a 14F9).

Pre definíciu lokalizácie idiotopov 425 poznaných anti-idmi sa testuje na inhibičnú väzbu 425-EGFR použitím ELISA oproti sEGFR. Všetky inhibujú úplne svoju reaktivitu (obr.1), čo značí, že rozpoznávajú idiotopy vo väzbových miestach antigénu.

Pre definovanie 5A6, 3B6 a 15H8 Anti-idy ako Ab2b sa zisťuje, či koincidujú idiotypy rozpoznané na mAb s CDR alebo s väzbovým miestom antigénu. Pre tieto analýzy sa zostavia krivky porovnávajúce inhibičné väzby s myšou (obr.2A) a humanizovanou (obr. 2B) verziou 425 mAb nepriamou skúškou ELISA pomocou buniek A431. Všetky tri Anti-idy môžu inhibovať väzbu obidvoch verzií 425, každý Ab2 má podobnú krivku inhibičnej väzby, čo ukazuje, že idiotypy 425 rozpoznané 5A6, 3B6 a 15H8 sú priamo implikované pre rozpoznávanie antigénu. 15H8 je 10-krát účinnejší pri inhibovaní väzby buniek 425-A431 než 5A6 a 3B6. Pre stanovenie stupňa súhlasu Ab2 k paratopu 425 sa vypočíta disociačná konštanta (KD) Anti-idov; konštanta KD každého Ab2 je uvedená v tabuľke I, 15H8 má vyššiu afinitu k 425 čo súhlasí s vyššou schopnosťou inhibovať väzbu EGFR-425. Tieto výsledky tiež naznačujú, že najmenej dva rôzne idiotypy na mAb425 sú rozpoznané Anti-idmi.

Tabuľka I

Ab2	KD
5A6	$1,002 \cdot 10^{-9}$ M
3B6	$1,250 \cdot 10^{-9}$ M
15H8	$0,300 \cdot 10^{-10}$ M

Syngenická (Balb/c), alogenická (B6D2F1) a xenogenická (potkany, králiky) indukcia AB3

Užitočnosť týchto Ab2 ako vakcín Id sa vyhodnocuje analýzou ich imunogenicity. Skutočný interný obrazec Ab2 by mal byť schopný vyvolať Ab3 so špecifitou podobnou Ab1 prekročením bariéry druhov. Ab3 sa generuje v myších, v potkanoch a v králikoch podľa hore opísaných imunizačných protokolov. Protilátky proti Anti-idom sú zistiteľné dva týždne po prvej dávke a dosahujú maximálnu úroveň 6 až 8 týždňov po podaní prvej dávky. Špecifická odozva proti imunizácii Ab2 sa udržiava až do 12 mesiacov u potkanov

a králikov, zatiaľ čo je prechodná u myší, kde klesá titer Ab3 v nasledujúcich mesiacov. Všetky králiky generujú anti-myší Igy; titer séra Ab3 proti imunizácii Ab2 je 5 až 10 krát vyšší ako proti izotypu a alotypu porovnateľných Ig, čo naznačuje, že imunitná odozva proti konštantnej oblasti Ab2 nenarušuje imunitnú odozvu voči oblasti V.

Pre stanovenie účinnej imunizácie voči tým determinantom Ab2, ktoré spôsobujú kontakt s paratopom mAb 425 (kde by mali byť umiestnené antigén-simulujúce idiotopy), sa vykonáva skúška inhibičnej väzby, kde sa merí väzba 5A6, 3B6 alebo 15H8 Ab2 na mAb 425 v prítomnosti sériových zriedení séra Ab3 zo zvierat imunizovaných Ab2 alebo neodvodených myších mAb. V tabuľke II sú uvedené zriedenia séra Ab3, ktoré vytvárajú 100% inhibíciu väzby Ab2-Ab1, z myší Balb/c (A), králikov (B) a potkanov (C). Ako je to zrejmé z tabuľky II A, B a C, všetky séra anti-5A6 Ab3 vzrastú v 3 druhoch inhibovaných 5A6 a 3B6 mAb-426 väzbou s rovnakou účinnosťou, séra anti-3B6 vykazujú podobný inhibičný obrazec, čo naznačuje, že obidva Anti-idy majú rovnaké idiotopy. Okrem toho sa zisťuje, že niektoré Anti-15H8 séra potkanov a myší inhibujú väzbu 5A6 a 3B6 na 425, čo naznačuje parciálnu idiotypickú identitu. Také reaktivity sa nenachádzajú v králičom sére Anti-15H8, čo značí, že odozva Ab3 v králikoch môže byť zameraná hlavne proti iným viacej imunodominantným idiotopom, pričom je táto možnosť tiež podporovaná nálezom vyšších inhibičných titrov v králičom sére Ab3 než u myší a potkanov.

Antigénová totožnosť medzi 5A6 a 3B6 sa sleduje konkurenčnou skúškou ELISA, testujú sa sériové zriedenia (10^{-3} až 10^{-5}) séra Ab3 králikov a potkanov na väzbu k Ab2 v prítomnosti rovnakého objemu (1 mg/ml) Ab2 alebo kontrolných mAb. Na obr. 3 sú krivky inhibície väzby zodpovedajúce séru Ab3 potkanov. 5A6 a 3B6 vytvárajú identický repertoár v potkanoch a králikoch: séra Anti-5A6 reagujú rovnako dobre s 5A6 alebo 3B6 Ab2 povlakoch na doštičkách ELISA a sú tiež inhibované obidvoma Ab2. Králičí sérum Ab3 má podobný obrazec inhibície ako pre séra potkanov, znázornené na obr. 3.

Tabuľka IIA

Balb/c Ab3	Ab2-mAb 425 inhibícia väzby		
	5A6	3B6	15H8
5A6	1/600	1/600	-
	1/1200	1/1200	1/150
	1/300	1/300	-
	1/4800	1/2400	1/75
	1/4800	1/4800	1/150
3B6	1/6400	1/6400	-
	1/2400	1/2400	-
	1/4800	1/4800	-
	1/800	1/800	-
	1/4800	1/4800	-
15H8	-	-	1/9600
	-	-	1/9600
	-	-	1/9600
	-	-	1/9600
	1/2400	1/2400	1/9600
F111	-	-	-
KLH	-	-	-
-	-	-	-
Preimmun. sérum	-	-	-

Tabuľka IIB

Rabbit Ab3	Ab2-mAb 425 inhibícia väzby		
	5A6	3B6	15H8
5A6	1/3200	1/3200	-
	1/12800	1/12800	-
	1/6400	1/12800	-
	1/12800	1/6400	-
	1/12800	1/12800	-
3B6	1/6400	1/6400	-
	1/3200	1/6400	-
	1/12800	1/12800	-
	1/12800	1/12800	-
	1/12800	1/12800	-
15H8	-	-	1/12800
	-	-	1/12800
	-	-	1/1600
	-	-	1/3200
mAb15	-	-	N.D
F111	-	-	-
mAb425	-	-	-
KLH	-	-	-
Preimmun. sérum	-	-	-

Tabuľka IIC

Rat Ab3	Ab2-mAB 425 inhibícia väzby		
	5A6	3B6	15H8
5A6	1/2400 1/2400	1/4800 1/2400	- -
3B6	1/2560 1/1280	1/2560 1/2560	- -
15H8	1/160 -	1/320 -	1/2560 1/1280
F111	-	-	-
MAB 15	-	-	-
KLH	-	-	-
Preimmun. séra	-	-	-

Identifikácia protilátok Anti-EGFR Ab3

Antireceptorové protilátky sa detektujú v sére Ab3 priamou imunofluorescenciou proti bunkám A431 a C33A a výsledky sú uvedené v tabuľke III.

Tabuľka III

Ab3 ^c	Imunofluorescencia		ELISA	
	A431	C33A ^a	A431	sEGFr ^b
Anti-5A6	7/14	0/14	6/14	5/15
Anti-3B6	10/13	0/13	6/13	5/16
Anti-15H8	4/12	0/12	0/12	0/11
Anti-mAb15	0/2	0/2	0/2	0/4
Anti-R24	0/3	0/3	0/3	0/3
KLH	0/5	0/5	0/5	0/4
preimmun. séra	0/20	0/20	0/20	NT

Vakcinácia Anti-Id v myšom systéme indukuje vytváranie protilátok Anti-EGFR, v Ab3 z potkanov a z králikov však nemohli byť zistené žiadne protilátky Anti-EGFR. Vývoj protilátok Anti-EGFR v myších B6D2F1 potvrdzuje, že vakcinácia Ab2 nie je geneticky obmedzená na myšiu kmeň Balb/c. Špecifické protilátky dosahujú titrov 1/50 až 1/1600 pri testovaní sEGFR skúškou ELISA.

Inhibičná väzba Ab3-EGFR prostredníctvom 5A6, 3B6 a 15H8

Tieto skúšky sa vykonávajú pre testovanie, či Anti-idové simulácie v trojrozmernej štruktúre utvárajú EGFR. Rôzne zriedenia Anti-EGFR séra Ab3 z myšiu Balb/c a B6D2F1 sa zmiešajú s Anti-idmi a nechajú sa reagovať 4 hodiny pri teplote miestnosti, potom sa testujú na antireceptorové protilátky doštičkami potiahnutými sEGFR a percento inhibície sa vypočíta z hodnôt OD znázornených na obr. 4. 5A6 a 3B6 dáva 100% inhibíciu, čo naznačuje, že súhlasí trojrozmerná štruktúra pôvodného antigénu. 15H8 dáva 15 až 35% inhibíciu Anti-EGFR Ab3 od 5A6 alebo 3B6.

Bolo potvrdené, že interný obrazec Anti-idov môže nahradiť imunologické vlastnosti antigénu a vyvolať špecifickú odozvu v rôznych druhoch, nie je tomu tak v prípade 5A6 a 3B6, ktoré zlyhávajú vo vyvolaní Anti-EGFR u potkanov a králikov; uskutočnené sérologické testy však naznačujú, že anti-receptorové protilátky detektované v myšiach sú vyvolané idiotypovými determinantmi AB6 a B36 podobnými EGFR.

Primárne štruktúry Ab2 a porovnanie aminokyselinových sekvencií s EGFR.

Bolo vykonané sekvenovanie DNA za účelom analyzovania štruktúrnej bázy ich imunologických vlastností. Sekvencie VH a VL 5A6, 3B6 a 15H8 sú uvedené na obr. 5. Aminokyselinové sekvencie oblasti VH sa klasifikujú do podskupín IIID podľa Kabata. Oblasti VL 5A6 a 15H8 patria do skupiny kV a 3B6 do kIII podľa Kabata. Sekvencie CDR sú porovnané s aminokyselinovými sekvenciami ľud-

ského EGFR (GQHUE z databanky SPIRS), (obr.6) v uzavrených rámčekom sú uvedené zistené identické zvyšky a v otvorených rámčekoch sú ekvivalenty zvyškov. Maximálna homológia je nájdená medzi zvyškami 77-84 z CDR2H a zvyškami 125-129 z CDR3H a 70-76 z 5A6 a 74-80 CDR2L, najvyšších homologických oblastí EGFR, aminokyseliny 437-452 a 492-502 s CDR3H sú umiestnené v hypotetických ligandovo-väzbových oblastiach receptorového proteínu, ktorý opísal A. Ullrich a kol. (30). 15H8 má identické sekvencie CDR2H ale má odlišné sekvencie CDR3H a CDR2L. Pre určenie, akú úlohu hrá každá homologická CDR vo vytváraní interného obrazca EGFR, sa porovnali sekvencie 5A6 a 3B6 so známymi oblasťami VH a VL podľa Kabata. Zistilo sa, že niektoré reťazce VH podľa vynálezu sú vysoko homologické s 5A6 a s 3B6, vykazujú podobné CDR1H a CDR2H, čo naznačuje, že sekvencia CDR3H hrá hlavnú úlohu v rozpoznaní paratopu 425 a mimikrov EGFR. Zistilo sa, že existuje 63 Igov (hlavne myšieho a ľudského pôvodu) s oblasťami CDR3H čiastočne homologickými (50-87 %) s CDR3H z 5A6 a 3B6. Homologická aminokyselina sa hromadí, ako sa zdá, na zvyškoch 100H-102, zatiaľ čo menej homologická kyselina sa nachádza spolu so segmentom GYVG kde bola nájdená maximálna homológia s EGFR. Bolo zistené, že žiadna protilátka myšieho alebo ľudského pôvodu nemá zvyšok V v polohe 100D, ktorý je výlučne 4A6, 3B6. VL 5A6 a 3B6 vykazujú homológie s myšími kapa-reťazcami, úplne odlišné VL reťazcové sekvencie majú rovnakú špecifičnosť. Úloha CDR2L nie je priamo odvodená, ako sa zdá, z identity aminokyselín. 5A6 a 3B6 majú rôzne sekvencie konštruujúce identickú internú štruktúru obrazca EGFR, avšak homológie aminokyselín s EGFR sa javia ako akumulované v tejto oblasti.

Pre vyhodnotenie ich imunologického účinku ako vakcín Id, sa analyzovali postupne dostupnosť a antigenické vlastnosti oblastí CDR2H, CDR3H a CDR2L. Antigenický index (miera antigenickej pravdepodobnosti) sa vypočíta z programu ANTIGENIC, sekundárna štruktúra sa definuje programom DSSP pre stanovenie dostupnosti nájdených homologických sekvencií.

Analýzy primárnej a sekundárnej štruktúry ukazujú, že homologické zvyšky sú dostupné a tiež koincidujú s oblasťami vykazujúcimi pozitívny antigenický index, môžu byť preto priamo implikované do odozvy anti-interného obrazca. Reťazce VL5A6 a VL3B6 vykazujú 7 neidentických antigenických oblastí a 11024 a 11603 angstromov dostupného proteínového povrchu, schopného vytvárať antigenické idiotypy, avšak obidve protilátky generujú identické odozvy Ab3 u myší, králikov a potkanov. Tieto výsledky naznačujú, že Anti-Anti-idová odozva, zistená v tomto systéme, je výlučne zameraná na Id definované reťazce VH 5A6 a 3B6.

Pretože imunologická a štrukturálna analýza ukazuje, že Anti-idy 5A6 a 3B6 sú interným obrazom externej oblasti EGFR, analyzuje sa, prečo zlyháva vo vyvolaní odozvy v inom druhu. Pozitívna oblasť GYVGYAIDY CDR3H nesúca ekvivalentné segmenty GYVGY EGFR sa porovnávajú so sekvenciami CDR3H z myších, potkaních a králičích protilátok. Veľká skupina myších protilátok má sekvenciu YAIDY, takže medzi predpovedanou antigenickou oblasťou CDR3H sa očakáva, že zvyšky GYVG definujú privátny imunogenický idiotyp v myšiach. Nezistilo sa, že by králičí Ig mali sekvenciu YAIDY, čím je možné, že kráľčia Anti-Anti-Idová odozva je zameraná na iné idiotypy definované väčšími antigenickými oblasťami, ktoré kazia anti-internú obrazovú odozvu.

V súhrne sa vynález týka nasledujúceho:

V aktívnej imonoterapii rakoviny boli použité rôzne prístupy. Anti-idiotypické protilátky simulujúce imunologický účinok nádorových markérov boli aplikované u rakovinou postihnutých pacientov pre získanie špecifickej protinádorovej odozvy riadenej interakciami Id-Anti-Id.

Na vyvinutie špecifických vakcín pre EGFR boli získané Anti-idy mAbs zamerané proti mAb 425. Vybrané boli tri protilátky (5A6, 3B6 a 15H8) rozpoznávajúce kombinačné miesto asociovaných idiotypov na mAb425, definované svojimi sekvenciami CDR, ako to

bolo predvedené inhibíciou väzby humanizovanej verzie 425 mAb na EGFR.

Imunologické a sérologické skúšky ukázali, že 5A6 a 3B6 pôsobia ako interné obrazce vyvolávajúce špecifickú humorálnu odozvu v myšiach. Protilátky podobné Ab1 zo séra Ab3 sa viažu na membránovo viazaný EGFR na bunkách A431 a reaguje proti sEGFR. Reakcia je úplne inhibovaná ak 5A6, tak 3B6 Ab2 (nezávisle na Anti-idu použitom pre imunizáciu), čo naznačuje, že 5A6 a 3B6 nesú rovnaký interný obrazec EGFR. Imunologické údaje naznačujú čiastočný idiotypický súhlas s idiotypom interného obrazca 5A6 a 3B6 a 425 paratopne odvodený Id z 15H8, sérologické skúšky ukázali čiastočnú inhibičnú väzbu Anti-5A6 a Anti-3B6 myšieho Ab3 na Ab2 alebo EGFR v prítomnosti 15H8. Imunologické štúdie ukázali chýbajúci biologický efekt: boli indukované protilátky IgM (reagujúce s bunkami A431 avšak zlyhávajúce v rozpoznaní sEGFR), nie sú však inhibované 15H8. Tieto výsledky naznačujú, že v priebehu imunizačných protokolov boli aktivované nešpecifické klony.

Pre poznanie, aké štruktúry Anti-idov sú implikované v generovaní odozvy Anti-EGFR bol uskutočnený výskum štruktúrnej korelácie medzi Id a antigénom.

Po sekvenovaní 5A6, 3B6 a 15H8 a po porovnaní aminokyselinových homológov s EGFR bola nalezená sada homologických a ekvivalentných aminokyselín v antigenických a v dostupných oblastiach CDR2H, CDR3H a CDR2L. Tieto údaje súhlasia s početnými správami ukazujúcimi prítomnosť homologických sekvencií v CDR, (alebo v priľahlých oblastiach) z reťazcov VL a VH, ktoré participujú na štrukturálnom vytváraní interného obrazca nesúceho idiotypy (31 až 33). Poznatok, že rôzne sekvencie v 5A6 a 3B6 konštruujú dve protilátky s identickým imunologickým účinkom, umožnil analyzovať úlohu CDR a rámcových oblastí v indukcii odozvy Ab3 a v konformácii interného obrazca EGFR.

CDR2L, CDR2H a CDR3H z 5A6 a 3B6 sa pravdepodobne podieľajú na konštrukcii interného obrazca, pretože maximálna homológia a ekvivalentná aminokyselina bola nalezená s externou doménou EGFR v týchto oblastiach. Trojrozmerné mimikry hrajú, ako sa zdá, hlavnú úlohu. Toto zistenie je dokumentované nasledujúcimi poznatkami.

- a) CDR21L z 5A6 a 3B6 sú rozdielne, avšak dávajú vzniknúť rovnakej odozve Anti-EGFR.
- b) V neodvodených protilátkach boli nájdené homologické zvyšky z CDR2H, takže ich účasť v internej štruktúre obrazca nezávisí od výlučne lineárnej identity.
- c) Afinity zistené medzi CDR a zvyškami 148-154, 437-452 a 492-502 z EGFR sa zakladajú hlavne na ekvivalentnej aminokyseline.
- d) Ekvivalentná aminokyselina sa hromadí v týchto CDR, avšak nie v iných oblastiach.

Idiotypická analýza niekoľkých rodín protilátok (Anti-PC, Anti-dextrán, Anti-glaktán, Anti-NIP) vykonaná Daviom a kol., (34) ukázala, že v systéme hnanom antigénom, zahŕňa výraz Id minimum aminokyselín z CDR2H, CDR3H a párovanie so špecifickými reťazcami L. Uvedené imunologické a sekvenčné údaje naznačujú, že podľa vynálezu bola generovaná Idovou kaskáda Ab1-Ab2-Ab3, obmedzená na súbor idiotypických oblastí definovaných paratopom 425 a paratopom Ab2. Najvýznamnejšou snahou bolo získať dve Ab2, 5A6 a 3B6 vykazujúce identické imunologické vlastnosti (a tým idiotypické determinanty) pochádzajúce z identických reťazcov VH spárovaných s rôznymi reťazcami VL.

Biologická účinnosť Anti-idových protilátok koreluje s ich afinitou s idiotypickým repertoárom v receptorovom druhu. Analýza zvyškov implikovaných vo vytváraní 5A6 a 3B6 štruktúry interného obrazca ukázala, že sú začlenené do väčšej antigénovej oblasti

(zvyšky 100F-101 v H-reťazci) zistené ako homologické s ostatnými myšimi protilátkami (z databázy proteínov NBFR) ale nie v králikoch. Preto interná štruktúra obrazca determinuje idiotyp "registrovaný" myším imunitným systémom ale maskovaný väčšou idiotypickou oblasťou pri podávaní králikom. Tato domnienka je tiež podporená imunologickými výsledkami: Titre sér Anti-5A6 a Anti-3B6 paratopicky odvodennej Ab3 sú vyššie u králikov ako u myší. Zistilo sa tiež, že homologické zvyšky 100F-101 sú prítomné v ľudských protilátkach (z databázy NBRF), čo poskytuje teoretický základ pre účinnosť interného obrazca 5A6 a 3B6 v ľudskom systéme.

Účinnosť interného obrazca antiidiotypických protilátok ako vakcín bola demonštrovaná v rôznych zvieracích modeloch a v klinických pokusoch. Získanie anti-idov rozpoznávajúcich protilátky Anti-EGF opísal nedávno Suarez (Suarez, E. a kol., Immunologia 12, str. 122, 1993), ktorý získal 4 neinterné obrazce mAbs.

5A6 a 3B6 sú prvými internými obrazcami Anti-id mAb napodobujúcimi externú oblasť ľudského EGFR. Biologické charakteristiky mAb 425 určujú, že 5A6 a 3B6 simulujú ligandové väzbové miesto EGFR.

Sérologické štúdie, biologický účinok na zvieracích modeloch a štruktúrna analýza naznačujú ich potenciálnu hodnotu pre vakcináciu ľudí.

Terapeutické a diagnostické využitie

Protilátky podľa vynálezu môžu byť podávané ľudským pacientom pre terapiu. Vynález sa preto tiež týka farmaceutického prostriedku, ktorý ako účinnú zložku obsahuje najmenej jednu protilátku alebo protilátkový fragment podľa vynálezu spolu s jedným alebo s niekoľkými farmaceuticky prijateľnými látkami zo súboru zahŕňajúceho nosič, excipient alebo riedidlo.

Protilátky podľa vynálezu sa spravidla podávajú intravenózne alebo parenterálne. Všeobecne je dávka pre podávanie protilátkových fragmentov dostatočne veľká na vytvorenie žiadúceho potlačenia nádoru a účinku lýzy nádoru. Dávka závisí od veku, stavu, pohlavia a rozsahu ochorenia pacienta a môže byť 0,1 až 200 mg/kg, s výhodou 0,1 až 100 mg/kg denne, počas jedného až niekoľkých dní.

Prostriedky pre parenterálne podanie zahŕňajú sterilné vodné alebo nevodné roztoky, suspenzie a emulzie. Príkladmi nevodných rozpúšťadiel sú propylénglykol, polyetylénglykol, rastlinné oleje ako olivové oleje, vstrekovateľné organické estery ako je etylénoleát a iné rozpúšťadlá známe v odbore, vhodné pre tieto účely. Protilátky podľa vynálezu môžu byť používané v prostriedkoch, obsahujúcich fyziologicky prijateľný nosič. Príklady takých vhodných nosičov sú roztok chloridu sodného, PBS, Ringerov roztok, alebo laktátovaný Ringerov roztok. Vo farmaceutických prostriedkoch môžu byť zastúpené tiež ochranné látky a iné prísady, ako antibiotiká, antioxidanty a chelatačné činidlá.

Protilátka (alebo prípadne protilátkový fragment) môžu byť konjugované známymi spôsobmi s cytokinmi, ako je IL-2 na podporu ich cytotoxicity.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu sa hodia na ošetrovanie nádorov všetkých druhov, vrátane melanómov, gliómov a karcinómov, rovnako ako nádorov obehového systému a pevných nádorov. Pre diagnostické účely môže byť protilátka konjugovaná, napríklad s rádio-opakným farbivom alebo môžu byť rádiologicky značené. Výhodným spôsobom značenia je metóda jódogénna. S výhodou sa protilátka pre diagnostické účely podáva ako fragment $F(ab)'_2$ alebo scFv. To poskytuje vynikajúce výsledky, takže substrakcia pozadia nie je nutná.

Príklady rozpracovania vynálezu

Príklad 1

Humanizovaný mAb 425

Byla opísaná humanizácia mAb 425 (Kettleborough, C.A a kol. Protein Eng., 4, str. 773, 1991). Prebudovaná forma mAb425 obsahuje myši CDR vrúbľovaný na ľudské variabilné oblasti zahŕňajúce štruktúru miesta antigénovej väzby. Použitý bol na presnejšie definovanie umiestnenia idiotypov 425 rozpoznaných Ab2.

Príklad 2

Príprava Anti-idiotypických mAb na Anti-EGFR 425 mAb

Myši Balb/c sa senzibilizujú injekciou i.p. 75 mg vyčisteného 425 mAb spojeného s KLH (Sigma), polymérovaného s glutaraldehydom a zmiešaného s CFA (Difco). Zvieratám sa podá 7., 14., 21., 28. a 38. deň rovnaký imunogén emulgovaný IFA. Fúzia sa vykoná 3 dni po poslednej dávke. Slezinové bunky imunizovaných myši sa fúzujú s HL1-Friendly Myeloma-653 pomocou 1450 polyetylénglykolu (Boehringer Mannheim) podľa opísaného protokolu (Carceller, A. Sangre 33 (3), str. 220, 1988). Fúzované bunky sa pestujú v prostredí obsahujúcom 39 % RPMI 1640, 39 % Hybridoma Medium

(Gibco), 20 % zárodočného telacieho séra a 2 % HAT. Pozitívne hybridy sa klonujú trikrát limitovaným riedením.

Príklad 3

Detekcia a analýza aktivity Ab2

Anti-idiotypické protilátky sa detektujú sendvičovou skúškou ELISA s polystyrénovými mikrotitrovými doštičkami (Nunc, Maxi-sorb), potiahnutými 1 mg/ml čisteného 425 mAb. Doštičky sa bloku-

jú 2% BSA-PBS a surové supernatanty alebo zriedené sérá v 0,2% BSA-PBS sa inkubujú cez noc pri teplote 4°C. Po premytí PBS-0,05% Tween 20 sa pridá biotinylovaný mAb 425, pripravený spôsobom, ktorý opísal Harlow a Lane (ako je to hore uvedené) v priebehu jednej hodiny pri teplote 37°C, doštičky sa omyjú trikrát a pridá sa HRPO-streptavidín (Dako), zriedený 1/1000 v 2% BSA-PBS. Ako substrát sa použije roztok 3,3,5,5-tetrametylbenzidínu (Sigma). OD sa merí pri 450 nm.

Príklad 4

Disociačná konštanta (KD) Ab2 mAb 5A6,3B6 a 15H8

Toto stanovenie sa uskutoční spôsobom podľa Frigueta (Friguet a kol., J. Immunol. Methods, 77, str. 305, 1985), stručne: sériové zriedenia mAb425 ($2 \cdot 10^{-8} \text{M}$ až $2 \cdot 10^{-11} \text{M}$) sa inkubujú s pevnými koncentráciami Ab2 až do dosiahnutia rovnováhy. Koncentrácia voľnej Ab2 sa merí nepriamou skúškou ELISA pomocou mikrotitrových doštičiek potiahnutých 1 mg/ml mAb 425 a HRPO-králičieho Anti-myšieho IgG1 (Zymed).

Príklad 5

Externá doména (sEGFR) vyčisteného ľudského EGFR

Čistenie externej domény ľudského EGFR a imunoafinitná chromatografia z EGFR sekretovaného bunkami A431 je opísaná v práci Webera (Weber a kol., J. Biol. Chem. 259 (23), str. 14631, 1984). Použije sa pre potvrdenie špecifity Ab3 nepriamymi alebo konkurenčnými skúškami.

Príklad 6

Skúšky lokalizácie idiotypov rozpoznaných 425 mAb

Lokalizácia 425 idiotypov definovaných 5A6, 3B6 a 15H8 sa skúša s ohľadom na schopnosť inhibovať väzbu 425-EGFR. Táto analýza sa najprv vykoná s čistým sEGFR. Surové supernatanty a 50 mg/ml čistenej Ab2 sa zmieša s 125 ng mAb 425. Po štvorhodinovej inkubácii pri teplote 37°C sa skúša aktivita 425 skúškou ELISA za pomoci mikrotitrových doštičiek potiahnutých 2,5 mg/ml sEGFR. Doštičky sa omyjú trikrát PBS-1% BSA a pridá sa AP-Rabbit Anti-Mouse Ig (Dako). Ako substrát sa použije roztok 3,3',5,5'-tetrametylbenzidínu. OD sa merí pri 450 nm v zariadení Titertek Multiscan plate reader.

Tieto analýzy sa doplnia porovnaním ich inhibičných väzbových kriviek myšej a pretvarovanej 425: 100 ng/ml myšej alebo pretvarovanej 425 sa zmieša s rovnakými objemami s rastúcou koncentráciou ($2 \cdot 10^{-2}$ až $2 \cdot 10^{-1}$) čistenej Ab2 5A6, 3B6, 15H8 alebo neodvodenej myšej protilátky IgG1. Zvyšná aktivita sa merí skúškou Cell-ELISA proti bunkám A431 vopred fixovaným v mikrotitrovej doštičke ($5 \cdot 10^5$ /jamka) s 0,1% glutaraldehydom. Po 60-minútovej inkubácii pri teplote 37°C sa bunky premyjú trikrát PBS - 1% BSA - 0,05% Tween 20. HRPO-Goat-Anti murine IgG2a (Dianova) a HRPO-Goat Anti-human IgG sa použije na detekciu väzby Ab1, ako substrát sa použije ortofenyldiamín (Sigma).

Príklad 7

Generácia Ab3 v syngenickom (Balb/c myši), alogenickom (F6D2F1 myši) a xenogenickom (potkany Wistar a králiky NZW) systému a detekcia Ab3

Vyčistené Ab2 sa spoja s KLH (Calbiochem) glutaraldehydom (Sigma) a emulgujú sa s CFA alebo IFA. Zvieratám sa podáva v dňoch 0, 15, 30 a 60. Pri niektorých skúškach sa prídavné injekcie podávajú o 8 až 12 mesiacov neskôršie za účelom zistenia stálosti odozvy Ab3. Pri každej dávke dostanú zvieratá 75 mg (myši), 150 mg (potkany) a 300 mg (králiky) celkového Ig intra-peritoneálnou inokuláciou (myši) alebo subkutánne v rôznych

miestach (potkany a králiky). Kontrolné skupiny dostanú rovnaké dávky irelevantné na KLH-kopulovanom Ig alebo KLH samotého. Vzor-
ky krvi sa zhromaždia v deň 0 a 1 týždeň po každej dávke. Sériové
zriedenia séra (v PBS - 0,15 % sušeného mlieka) sa umiestnia na
mikrotitrovú doštičku predtým potiahnutú 1 mg/ml Ab2 alebo inou
myšou Ig. Viazané anti-anti-idy sa detektujú biotinylovanou Ab2
(v myšom sére Ab3), HRPO-Rabbit-Anti Rat Ig (Dako) deprivované na
vzájemnú reaktivitu voči myším Igom a HRPO Swine Anti-Rabbit Ig
(Dako). Anti-izotypické a alotypické protilátky vyvinuté v potka-
noch a v králikoch sa eliminujú extenzívnou adsorpciou 1/50-1/100
vzoriek zriedených sér s myšou IgG1 po inkubácii cez noc pri te-
plote 4°C.

Príklad 8

Inhibícia väzby Ab2-Ab-1 sérami Ab3

Táto skúška sa vykonáva pre detekciu protilátok reagujúcich
s miestami Ab2, ktoré vytvárajú kontakt s mAb 425-paratopom. V
podstate 8 až 16 ng/ml vyčistenej 5A6, 3B6, 15H8 a F111 sa zmieša
so sériovými zriedeniami obsahujúcimi séra Ab3, po nočnej inkubá-
cii pri teplote 4°C, zvyšná aktivita Ab2 sa detektuje priamou
skúškou ELISA proti 1mg/ml 425 potiahnutých na polystyrénových
doštičkách. Väzba Ab2 sa detektuje PA-Rabbit Anti-Mouse IgG1
(Zymed).

Príklad 9

Stanovenie idiotypickej identity Ab2 vzájomnou konkurenciou na väzbu Ab3

Pre stanovenie idiotypickej identity medzi každou anti-
idovou protilátkou, sa skúša Ab2 na inhibíciu väzby séra Ab3 na
doštičky potiahnuté Ab2. Sériové zriedenia potkanieho séra Ab3
(10^{-3} až 10^{-5}) sa skúšajú na väzbu Ab2 v prítomnosti rovnakého
objemu (1mg/ml) Ab2 alebo kontrolných mAb vopred inkubovaných
cez noc pri teplote 4°C.

Príklad 10

Detekcia protilátok Anti-EGFR s odozvou Ab3

Skúšajú sa séra Ab3 myší, potkanov a králikov na aktivitu podobnú Ab1 pomocou Cell-ELISA proti bunkám A431 ako je to hore opísané alebo skúškou ELISA so sEGFR (2,5 mg/ml). Ako druhá protilátka sa použije HRPO Rabbit Anti-Mouse Ig (Dako), Rabbit Anti-Rat Ig (Dako) a Swine Anti-Rabbit Ig (Dako). Antireceptorové protilátky sa testujú tiež priamo imunofluorescenčnou skúškou pri použití nefixovaných živých buniek A431, pestovaných v Terasaki doštičkách.

Príklad 11

Inhibícia väzby EGFR-Ab3 prostredníctvom Anti-idov 5A6, 3B6 a 15H8

Konkurenčnou skúškou sa skúšajú determinanty medzi receptorom a anti-idmi. Cez noc sa inkubuje pri teplote 4°C 120 až 240 mg/ml 5A6, 3B6, 15H8 alebo neodvodeného IgG1 so zriedeniami 1/25 až 1/150 Ab3 sér Anti-EGFR a skúšajú sa na Anti-receptorovú aktivitu skúškami ELISA, Cell-ELISA a skúškou priamej imunofluorescencie. Percento inhibície sa vypočíta nasledujúcim spôsobom:

$$\% \text{ inhibície} = 1 - \left(\frac{\text{OD s Ab2} - \text{OD pozadia}}{\text{OD bez Ab2} - \text{OD pozadia}} \right) - 100$$

Príklad 12

Príprava RNA a cDNA

Z hybridomných bunecných línií 5A6, 3B6 a 15H8 sa izoluje celková RNA. Bunky vyprané v PBS sa suspendujú v roztoku guanidíniumtiokyanátu a RNA sa izoluje spôsobom ultraodstredenia gradientu chloridu cézia podľa Chirgwina (Chirgwin a kol., Bioche-

mistry 18, str. 5294, 1979). Súpravou Pharmacia sa syntetizuje prvá-reťazcová cDNA. Syntéza sa vykoná v 15 μ l s 5 μ g RNA, behom jednej hodiny pri teplote 37°C. Prvý reťazec cDNA sa použije priamo zo zosilnenia bez predbežného klonovania.

Príklad 13

Zosilnenie PCR

Na zosilnenie kopii myších variabilných oblastí s ľahkým reťazcom sa použije súbor PCR primerov. Primery 5' sú určené k hybridizácii vodcovskej sekvencie. Primery sú zmesi 61 oligonukleotidov, pre variabilnú oblasť s ťažkým reťazcom a 405 oligonukleotidov pre variabilnú oblasť s reťazcom kapa. Primery 3' sú určené k prevedeniu do konštantnej oblasti. Použijú sa špecifické IgG1 kapa myšie primery.

Na zosilnenie s termostabilnou polymerázou DNA sa 25 μ l reakčné zmesi obsahujúce 1 μ l hybridu cDNA-RNA, 250 nM príslušnej zmesi primerov 5' a 3', 200 mM každej dNTP, 1 mM $MgCl_2$ (pre ľahký reťazec), 2 mM $MgCl_2$ (pre ťažký reťazec) a 1 jednotka polymerázy Taq (Cetus) prekryje minerálnym olejom a podrobí reakcii s počiatkom 60°C do 55°C teploty. Jedna desatina reakcie PCR prebehne na 1% agarózovej TAE gélovej elektroforéze a ofarbí sa etidiumbromidom na zviditeľnenie výsledných produktov PCR.

Príklad 14

Molekulárne klonovanie a sekvenovanie

1 μ l každého produktu PCR sa viaže do vektoru TA (Invitrogen, San Diego). Väzbové reakcie DNA do oblastí reťazca VH a VL každej Ab2 sa transformujú tepelným šokom do kompetentárnych buniek TG1 E coli. To vytvára šesť knižníc DNA, jednu z ľahkej variabilnej oblasti a ostatné z ťažkej variabilnej oblasti každej mAb. Kolónie sa selektujú na doštičkách LB s 100 μ g/ml kabenici-

línú a iné sa uchováávajú pre ďalšie analýzy. Pozitívne kolónie sa detektujú screeningom PCR alebo pomocou plazmidovej digescie, ako to opísal Güssow (Güssow, D. Clackson, T. T. Nucleic Acids Res. 17, str. 4000, 1989). Pripraví sa dvojreťazcové plazmidické DNA (Wizard preps, Promega Corp.) pre sekvenovanie z transformantov. Pomocou Taq polymerázy sa vykoná ukončenie dideoxy-nukleotidového reťazca spôsobom, ktorý opísal Sanger (Sanger, F. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, str. 5463, 1977). Použité primery v sekvenčných reakciách sa prevedú do vektoru TA.

Príklad 15

Počítačová analýza a porovnanie sekvencií

Na vypočítanie sekundárnej štruktúry Ab2 a jej príslušných zvyškov sa použije počítačový program DSSP (Sybil). Na predpovedanie antigénových oblastí sa použije metóda Kolaskara a Tongaonkara (Kolaskar a kol., FEBS-Lett. 276(1-2) str. 172, 1990). Homológie Ab2 a EGFR sa definujú programom BESTFIT pomocou Gencorova disku pre porovnávaciu tabuľku symbolov. Porovnateľná ľudská sekvencia EGFR bola publikovaná skôr (Ullrich a kol., Nature 309: str. 418, 1984). Ab2 sa porovná s inými známymi Igmi pomocou databanky proteínového identifikačného zdroja (PIR) kompilovaného National Biomedical Research Fundation (NBRF) a programom PROSIS.

Priemyslová využiteľnosť

Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti nádorom, nesúca antigén receptoru epidermálneho rastového faktoru (EGFR), schopná napodobovať tento antigén. Podľa výhodného rozpracovania je protilátka odvodená od mAb 425 (ATCC HB 9629) alebo od jeho humanizovaného alebo chimerického derivátu. Protilátka je vhodná na výrobu farmaceutického prostriedku proti nádorom.

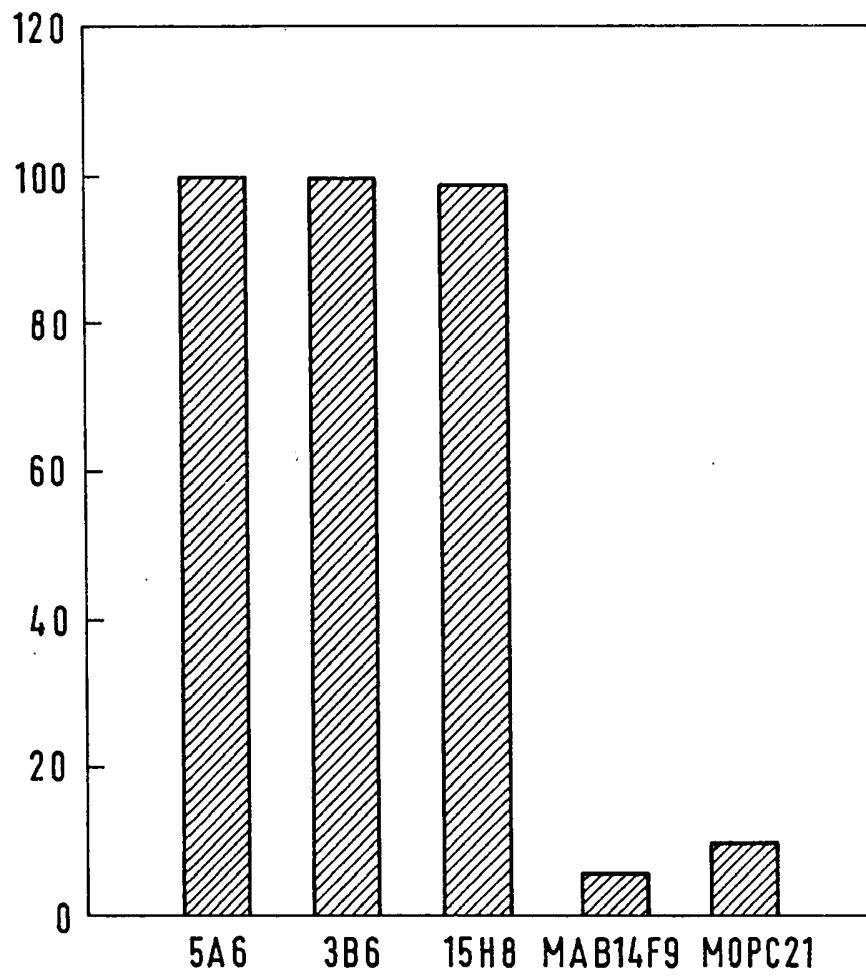
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru.
2. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1, ktorou je Ab2.
3. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 alebo 2, napodobujúca vnútorný obraz EGFR antigénu rozpoznávaný zodpovedajúcou myšou, humanizovanou alebo monoklonálnou Ab1 idiotypickou protilátkou.
4. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 3, pričom idiotypickou protilátkou je myšia mAb 425 (ATCC HB 9629) alebo protilátka od nej odvodená.
5. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 až 3 získateľná imunizáciou zvierata zodpovedajúcou myšou, humanizovanou alebo chimerickou idiotypickou protilátkou.
6. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 až 5, ktorej CDR oblasti a FR oblasti zahŕňajú aminokyselinovú sekvenciu podľa obr. 5A-F.
7. Monoklonálna anti-idiotypická protilátka navádzajúca imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 až 5, obsahujúca nukleotidovú sekvenciu podľa obr. 5A-F kódujúcu CDR a FR oblasti protilátky.

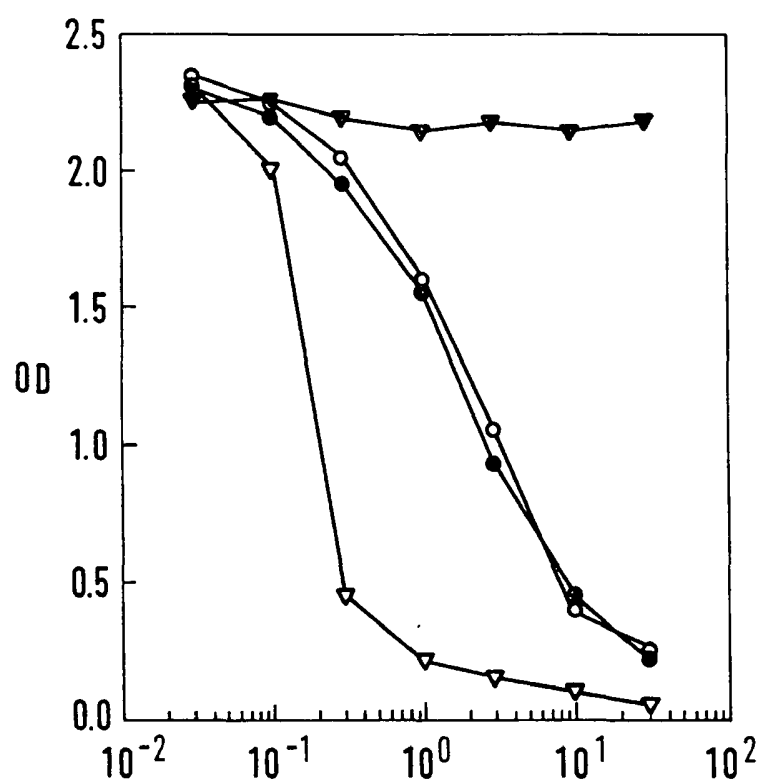
8. Spôsob prípravy monoklonálnej anti-idiotypickej protilátky navádzajúcej imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa zviera imunizuje zodpovedajúcou idiotypickou protilátkou, ktorá sa viaže na idiotypický antigén priamo svojimi CDR oblasťami, syntetizovaná antiidiotypická protilátka, ktorá sa viaže na idiotypy materinskej protilátky, sa oddelí a čistí sa známymi spôsobmi.

9. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu anti-idiotypickú protilátku navádzajúcu imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 až 6 a prípadne farmaceuticky vhodný nosič.

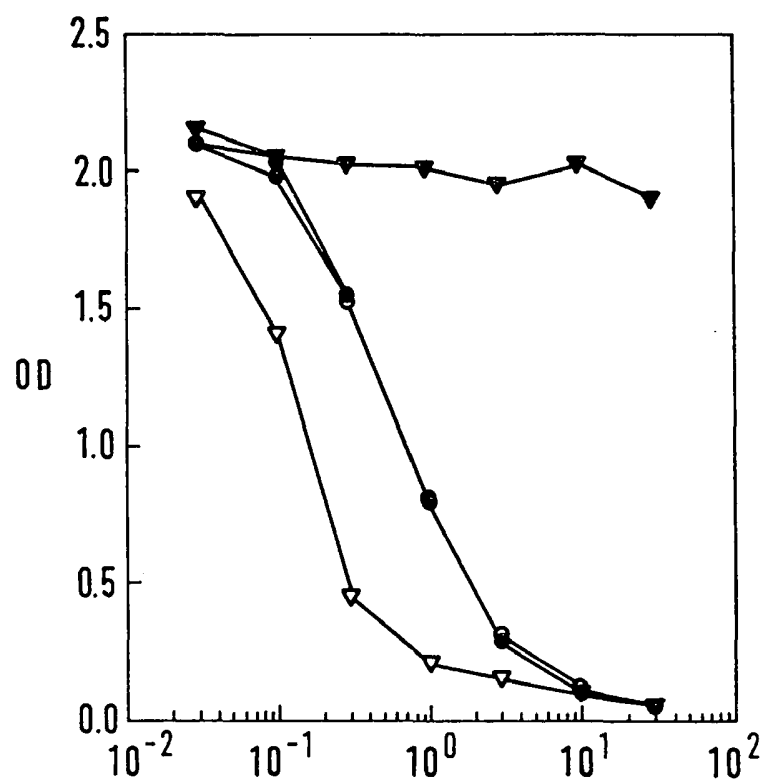
10. Použitie monoklonálnej anti-idiotypickej protilátky navádzajúcej imunitnú odozvu proti receptoru epidermálneho rastového faktoru podľa nároku 1 až 6 pre výrobu drogy proti nádorom.



OBR. 1

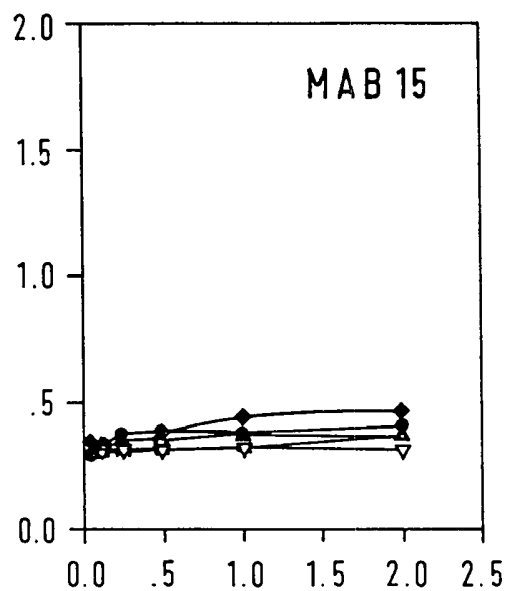
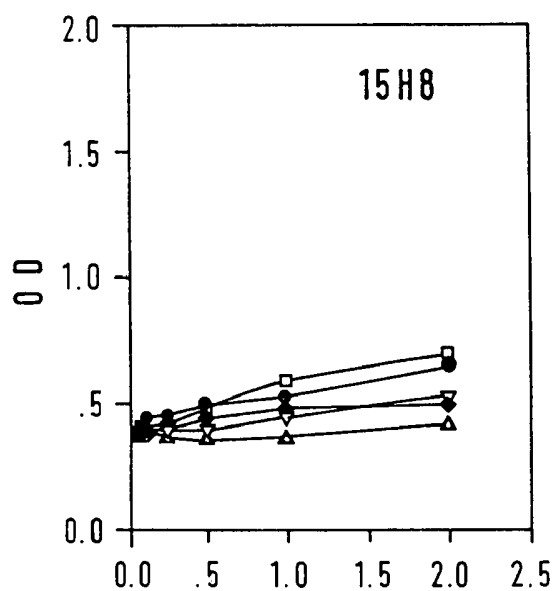
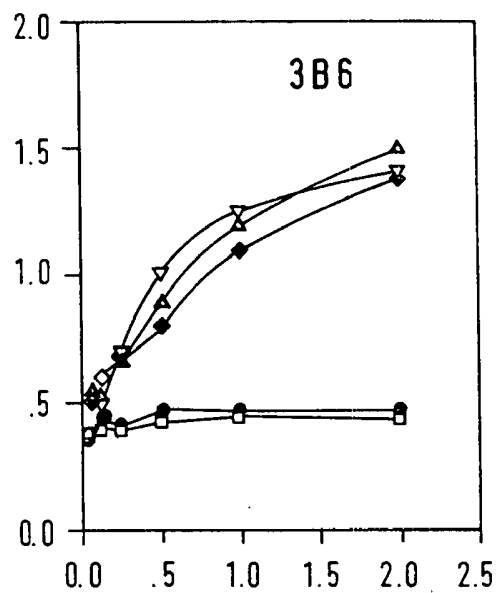
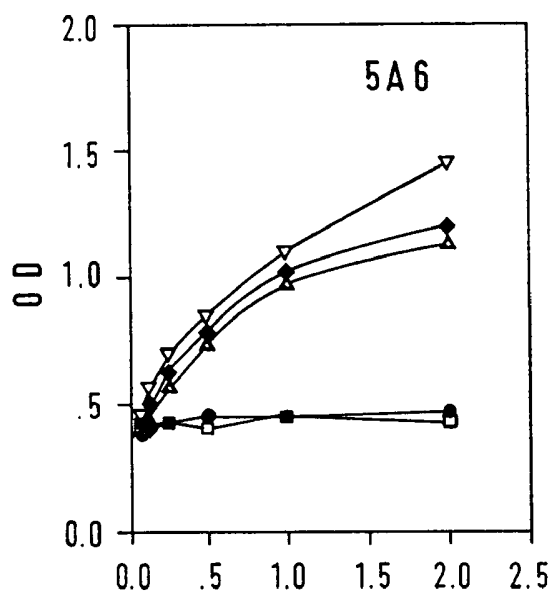


OBR. 2A

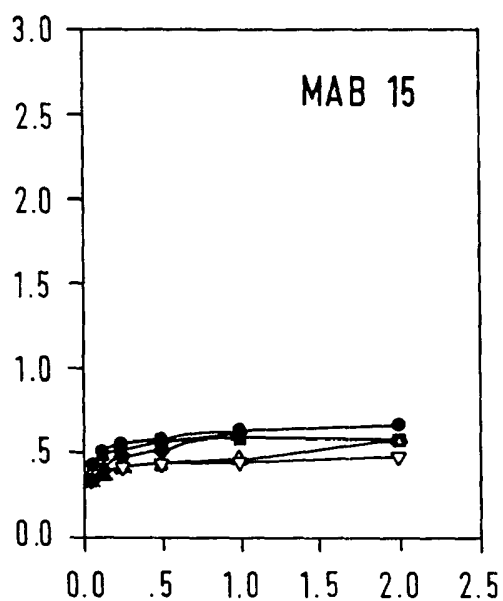
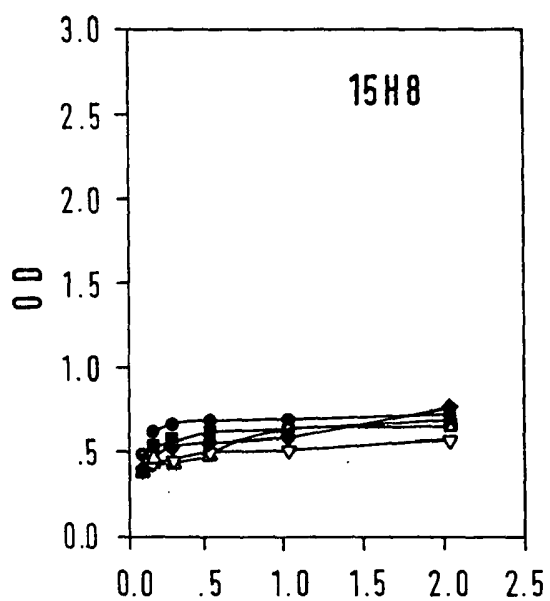
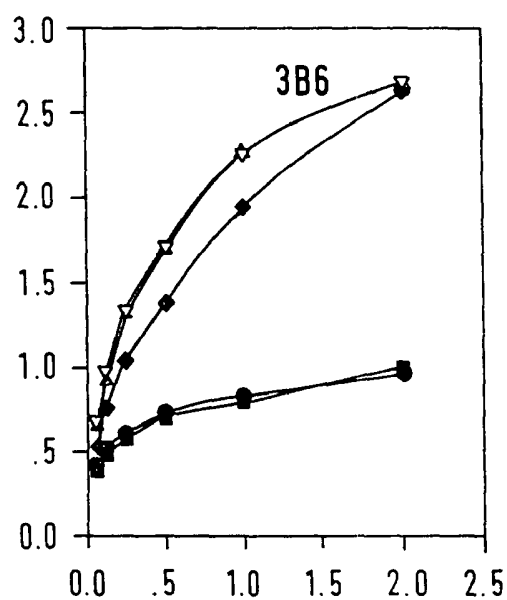
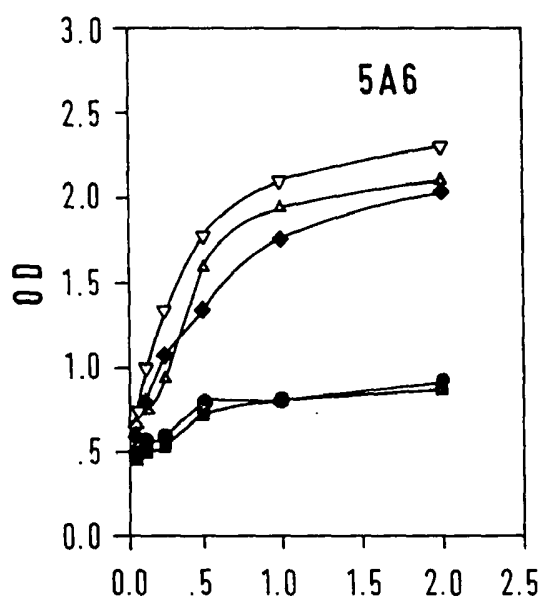


OBR. 2B

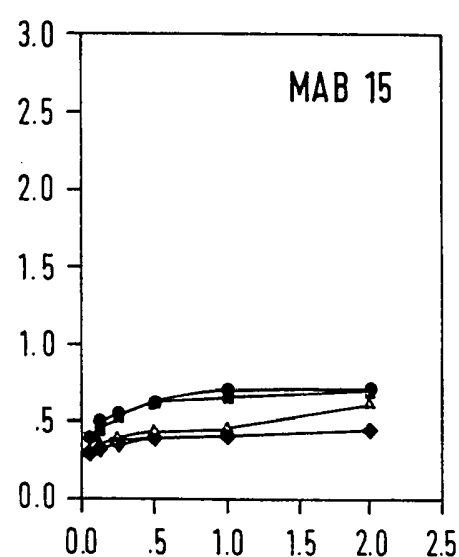
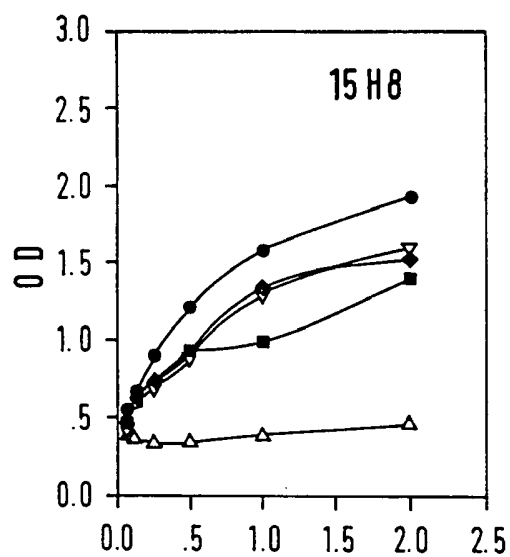
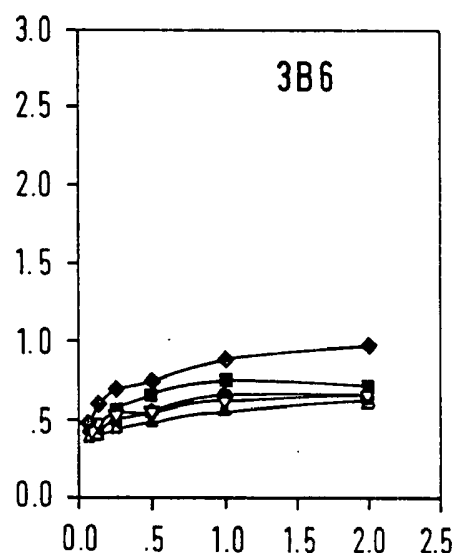
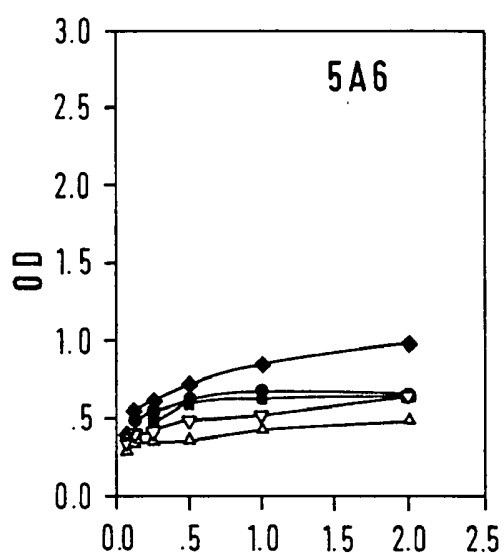
OBR. 3 A RAT Ab3 SERA ANTI-5A6



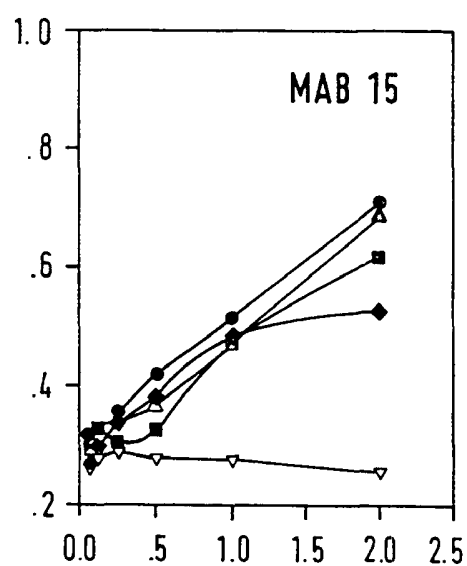
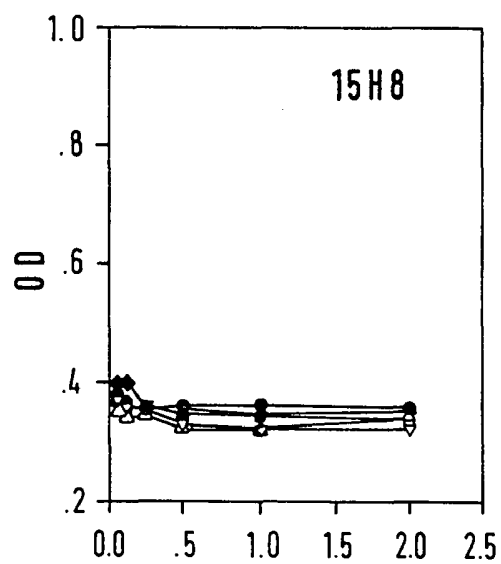
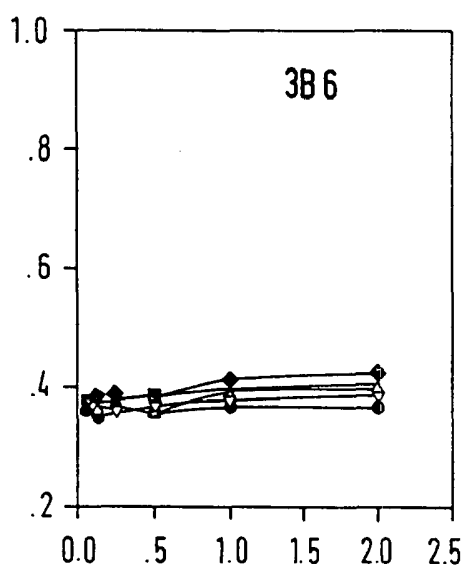
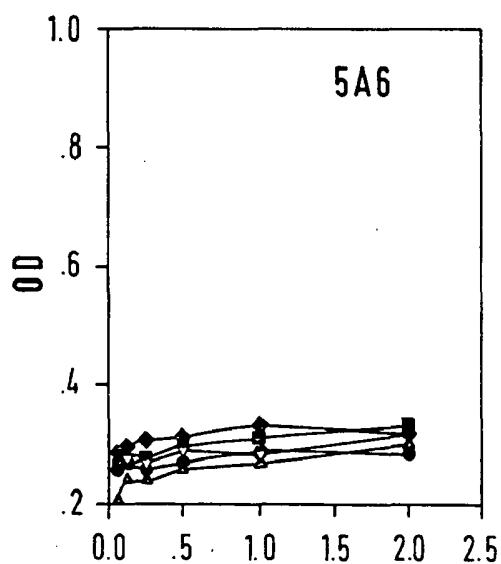
OBR.3 B RAT Ab 3 SERA ANTI-3B6

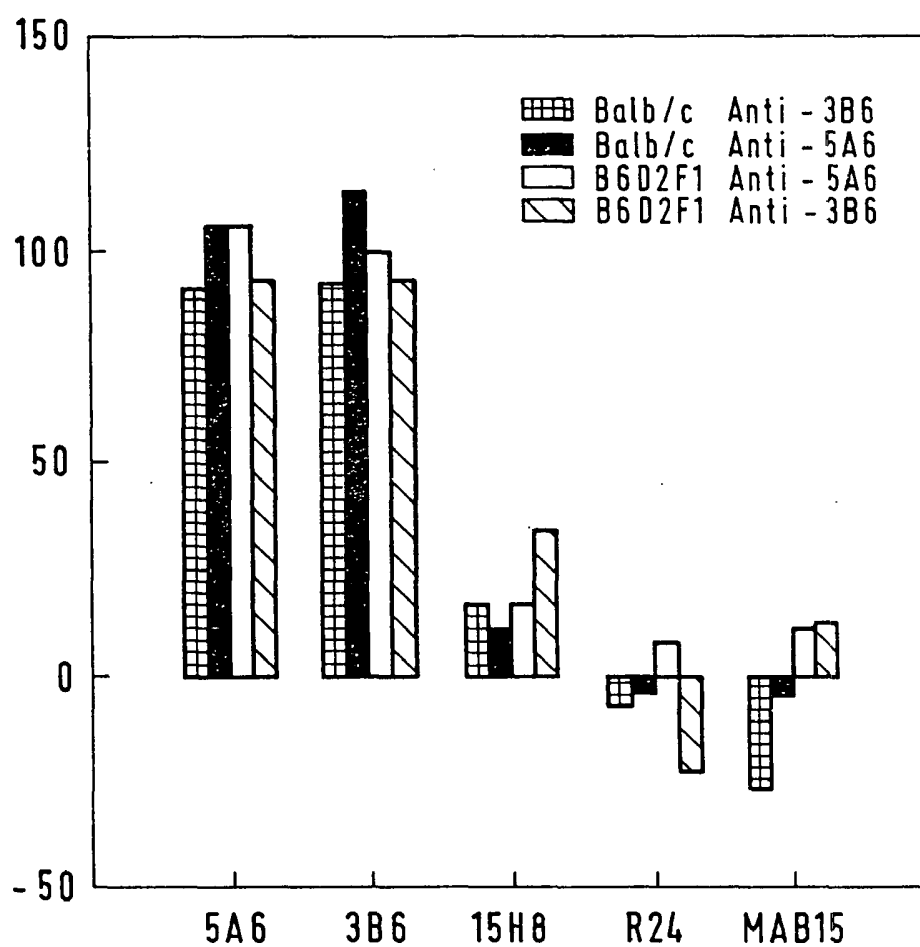


OBR. 3 C RAT Ab3 SERA ANTI-15H8



OBR.3 D RAT CONTROL SERA ANTI-MAB 15





OBR. 4

Leader

ATG GAC TCC AGG CTC AAT TTA GTT TTC CTT GTC CTT GTT TTG AAA GGT

Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
FR1

GTC CAG TGT GAA GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG

Val Gln Lys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

CDR1

FR2

AGT GAC TAT TAC ATG TAT TGG TTT CGC CAG CAT CCG GGA AAG AGG CTG

Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln His Pro Gly Lys Arg Leu

CDR2

GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT GAT GCT GGT ACT TAC ACC TAC TAT CCA

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

FR3

GAC AGT CTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC
Asp Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

AAC CTG TAC CTC CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG

Asn Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met

CDR3

TAT TTC TGT GCA AGA GAC GGG GCA GCT CGG ACT TCG TCC CAG GTT TAT

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ala Ala Arg Thr Ser Ser Gln Val Tyr

FR4

TAC TAT GGT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC

Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

Mouse constant IgG1

TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA TTC CCG GGT TCC

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Phe Pro Gly Ser

OBR. 5 A

Leader

ATG GGC TTC AAG ATG GAG TCA CAT ATT CAG GTC TTT GTA TTC GTG TTG
 Met Gly Phe Lys Met Glu Ser His Ile Gln Val Phe Val Phe Val Leu

FR1

CTC TGG TTG TCT GGT GTT GAT GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA
 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln

CDR1

AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG
 Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys

FR 2

GCC AGT CAG AAT GTT CGT ACT GCT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA
 Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

CDR2

GGG CAG TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TTG GCA TCC AAC CGG CAC ACT
 Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr

FR 3

GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

CTC ACC ATT AGC AAT GTG CAA TCT GAA GAC CTG GCA GAT TAT TTC TGT
 Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys

CDR3

FR4

CTG CAA CAT TGG AAT TAT CCT CTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG
 Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

Mouse constant kappa

GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

TCC ACC CGG
 Ser Thr Arg

OBR.5B

Leader

ATG GAC TCC AGG CTC AAT TTA GTT TTC CTT GTC CTT GTT TTA AAA GGT

Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly

FR1

GTC CTG TGT GAC GTG AAG CTC GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG

Val Leu Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

CTT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC

Leu Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

CDR 1

FR2

AGT AAC TAT TAC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAG AAG AGG CTG

Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu

CDR 2

GAG TTT GTC GCA GCC ATT AAT AGT AAT GGT GGT AGC ACC TAC TAT CCA

Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro

FR3

GAC ACT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC TTG

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu

CDR 3

TAT TAC TGT GCA AGA CAT CGG GGG AGG GAC AGC TCG GGC TAC GTA GGG

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Arg Asp Ser Ser Gly Tyr Val Gly

FR4

TAT TCT ATA GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA

Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

mouse constant IgG1

GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA TTC CCG GGT TCC

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Phe Pro Gly Ser

OBR.5C

Leader

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA
Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

FR1

GGT TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT GCT TCC TTA GCT
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala

CDR1

GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TAC AGG GCC AGC AAA AGT
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser

FR2

GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG AAC CAA CAG AAA CCA
Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro

CDR2

GGA CAG CCA CCC AGA CTC CTC ATC TAT CTT GTA TCC AAC CTA GAA TCT
Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser

FR3

GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACC
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCC TCA ACC TAT TAC TGT
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys

CDR3

FR4

CAG CAC ATT AGG GAG GTC TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA
Gln His Ile Arg Glu Val Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

Mouse constant kappa

ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser

ACC CGG

Thr Arg

OBR. 5D

Leader

ATG GAC TTT GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GTC CTT GTT TTT AAA GGT
 Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Phe Lys Gly

FR1

GTC CTG TGT GAC GTG AAG CTC GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG
 Val Leu Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

CTT GGA GGG TCC CTG AAA CTA TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC
 Leu Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

CDR1

FR2

AGT AAC TAT TAC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAG AAG AGG CTG
 Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu

CDR2

GAG TTT GTC GCA GCC ATT AAT AGT AAT GGT GGT AGC ACC TAC TAT CCA
 Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro

FR3

GAC ACT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC TTG
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu

CDR3

TAT TAC TGT GCA AGA CAT CGG GGG AGG GAC AGC TCG GGC TAC GTA GGG
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Arg Asp Ser Ser Gly Tyr Val Gly

FR4

TAT GCT ATA GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
 Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

mouse constant IgG1

GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA TTC CCG GGT TCC
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Phe Pro Gly Ser

OBR. 5E

Leader

ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC CTT GTA TTT TTG CTT TTC TGG ATT CCA
Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro

FR1

GCC TCC AGA GGT GAC ATC TTG CTG ACT CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser

CDR1

GTG AGT CCA GGA GAA AGA GTC AGT TTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGC
Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

FR2

ATT GGC ACA AGC ATA CAC TGG TAT CAA CAA AGA ACA AAT GGT TCT CCA
Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro

CDR2

FR3

AGG CTT CTC ATA AGT ATA CTT CTG AGT CTA TCT CTG GGA GTC CCT TCC
Arg Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Ser Leu Ser Leu Gly Val Pro Ser

AGG TTT AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTT ACT CTT AGC ATC AAC
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn

CDR3

AGT GTG GAG TCT GAA GAT ATT GCA GAT TAT TAC TGT CAA CAA AGT AAT
Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

FR4

AGC TGG CCA TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG TTG GAA ATA AAA CGG
Ser Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

Mouse constant kappa

GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC ACC CGG
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Arg

OBR. 5F

CDR2H

EGFR 437	V	I	I	S	G	N	K	N	L	C	Y	A	N	T	I	N	W	453
5A6 50	A	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y	P	D	T	V	K	G	65
3B6 50	A	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y	P	D	T	V	K	G	65
15H8 50	T	I	N	D	A	G	T	Y	T	Y	Y	P	D	S	L	K	G	65

CDR3

EGFR 492	W	G	P	E	P	R	D	C	V	S	C	R	N	Y	S	506	
3B6 95	H	R	G	R	D	S	S	G	Y	V	G	Y	A	I	D	Y	102
5B6 95	H	R	G	R	D	S	S	G	Y	V	G	Y	A	I	D	Y	102
15H8 95	H	G	A	A	R	T	S	S	Q	V	Y	Y	Y	G	M	D	102

CDR2L

5A6 50	T	L	L	S	L	S	L	56
EGF 148	F	L	S	N	M	S	M	154
3B6 50	L	V	S	N	L	E	S	56
15H8 50	L	A	S	R	N	H	T	56

OBR. 6