

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244962 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440067**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.31**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.07.03 BUP 27/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.04.08 WUP 15/2024**

(51) MKP:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**ADAMED PHARMA SPÓŁKA AKCYJNA,
Pieńków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**SEBASTIAN DOMINIK PAWLAK,
Stare Babice, PL
RÓŻA SAWICKA, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

recz. pat. Katarzyna Matusiewicz, Czosnów, PL

(54) Tytuł:

Przeciwciało anti-FOLR1 i jego zastosowanie w medycynie

PL 244962 B1

Opis wynalazku

Dziedzina techniki

Niniejszy wynalazek dotyczy przeciwciała, które wiąże się z receptorem folianu α (dalej określanym jako FOLR1, ang. Folate Receptor Alpha) i wykazuje aktywność cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciała. Dokładniej wynalazek dotyczy przeciwciała anty-FOLR1 i jego koniugatów ze związkami czynnymi farmakologicznie. Ponadto wynalazek dotyczy kompozycji farmaceutycznych zawierających takie przeciwciała i ich koniugaty.

FOLR1 jest zakotwiczonym w GPI białkiem błonowym o wysokim powinowactwie do folianu i pełni ważne funkcje związane z proliferacją lub przeżyciem komórek (Int J Cancer, 2006. 119(2): s.243-50.). FOLR1 wykazuje wzór ograniczonej ekspresji w prawidłowych tkankach nerki, płuca, jelita itp. (Anal Biochem, 2005. 338(2): s. 284-93).

Wysoką ekspresję FOLR1 obserwuje się w różnych nowotworach, takich jak rak jajnika (Anal Biochem, 2005. 338(2): s. 284-93, J Thorac Oncol, 2012. 7(5): s. 833-840) J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. 121(2): s. 225-33), rak nerki (Anal Biochem, 2005. 338(2): s. 284-93), rak płuc (Anal Biochem, 2005. 338(2): p. 284-93, rak piersi (Anal Biochem, 2005. 338(2): s. 284-93).

W szczególności doniesiono, że poziom ekspresji FOLR1 jest związany ze stopniem złośliwości, progresją i rokowaniem w raku jajnika (Int J Cancer, 1997. 74(2): s. 193-8, Int J Cancer, 1998. 79(2): s. 121-6). Ponadto doniesiono również, że rozpuszczalny FOLR1 był istotnie podwyższony w surowicy pacjentów z rakiem jajnika w porównaniu z surowicą zdrowych dawców (PLoS One, 2009. 4(7): p.e6292). Tak więc FOLR1 jest obiecującą cząsteczką docelową w leczeniu tych rodzajów raka.

LK26 jest znane jako mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko FOLR1 (EP 0197435). LK26 humanizowano przez zmianę CDR do podawania pacjentowi jako przeciwciało do leczenia raka (US 5952484). Jednak, jego powinowactwo zostało znacznie zmniejszone przez humanizację.

Znane jest przeciwciało MORAb-003, które ma równoważne powinowactwo wobec FOLR1 do przeciwciała LK26, oparte na humanizowanym przeciwciele LK26 (Cancer Immun, 2007. 7: s. 6). Uważa się, że aktywność przeciwnowotworowa in vitro MORAb-003 przypisywana jest aktywności ADCC i aktywności CDC.

Z drugiej strony, istnieje doniesienie, że MORAb-003 nie wykazuje aktywności hamującej wiązanie folianu, 5-metylotetrahydrofolianu (5-MTHF) lub pemetreksedu w komórkach FOLR1-dodatnimi, a samo przeciwciało nie hamuje proliferacji komórek FOLR1-dodatnich (Cancer Chemother Pharmacol, 2012. 70(1): p.113-20).

Badanie kliniczne I fazy wykazało, że MORAb-003 wykazuje bezpieczeństwo i tolerancję w dawkach od 12,5 do 400 mg/m² (Clin Cancer Res, 2010. 16(21): p. 5288-95). Co więcej, badanie kliniczne fazy II wykazało, że MORAb-003 w połączeniu z paklitaksem i karboplatiną wykazywał znaczącą aktywność przeciwnowotworową u pacjentek z nawracającym rakiem jajnika wrażliwym na platynę (J Clin Oncol, 2010, 28(15): 5001).

Jednakże, badanie kliniczne u pacjentek z nawrotowym rakiem jajnika opornym na platynę zostało przerwane z powodu możliwości niespełnienia punktu końcowego, jakim była poprawa wcześniej określonych kryteriów statystycznych (przeżycie bez progresji lub całkowity czas przeżycia) w analizie pośredniej.

Przykładem czynnika przeciwrakowego ukierunkowanego na FOLR1 może być EC-145, który jest wytwarzany przez sprzęganie czynnika przeciwrakowego z folianem, oprócz powyższego przeciwciała anty-FOLR1. Środek przeciwnowotworowy sprzężony z folianem wykazuje swoją skuteczność, opartą na właściwościach FOLR1 związanych z wychwytem folianu. Dlatego sugeruje się, że skoniugowany z folianem środek przeciwnowotworowy będzie nieskuteczny w komórkach rakowych o niskiej aktywności wychwytu folianu, chociaż FOLR1 ulega ekspresji w komórkach nowotworowych organizmu.

Pomimo ciągłego postępu w leczeniu raków litych i poprawy rokowania, nie odnotowano znaczącej poprawy rokowania w raku jajnika, odkąd w 1980 roku pojawiła się terapia z użyciem platyny (NatRev Cancer, 2011. 11(10): p. 719-25), a rak jajnika nadal jest główną przyczyną śmierci z powodu raka u kobiet. Powodem jest to, że rak jajnika staje się oporny na działanie platyny i w rezultacie nawracający rak jajnika jest nieuleczalny.

Oznacza to, że wyzwania w leczeniu raka jajnika to wydłużenie okresu przed nawrotem po odpowiedzi na chemioterapię z użyciem środka platynowego lub podobnego, zapobieganie oporności raka jajnika na środek platynowy i ustalenie terapii raka jajnika opornego na platynę.

Dodatkowym problemem w terapii z zastosowaniem przeciwciał, jest masa cząsteczkowa konwencjonalnego przeciwciała monoklonalnego (~150 kD), która jest zbyt duża, aby umożliwić przeniknięcie przeciwciała do tkanki, co skutkuje niższym skutecznym stężeniem w regionie guza i niewystarczającym efektem terapeutycznym.

Ponadto szereg faktów, takich jak długi cykl rozwoju, wysokie koszty produkcji oraz brak stabilności w pełni humanizowanych tradycyjnych przeciwciał, ogranicza ich zastosowanie i popularność w praktyce klinicznej. Problemатyczne jest także zwalidowanie dużoskalowych procesów składania fragmentów przeciwciał zawierających łańcuchy lekkie i ciężkie, a tym samym rozwiązania laboratoryjne skierowane do FOLR1 są trudne do przełożenia na skalę produkcyjną, a więc niedostępne w terapii.

Tak więc, nadal brakuje zadowalających konstruktów przeciwciał albo ich fragmentów skierowanych przeciwko FOLR1, które mogłyby być zastosowane w terapii. Dlatego pilną potrzebą w dziedzinie jest opracowanie nowych specyficznych konstruktów, które są skuteczne przeciwko nowotworom związanym z ekspresją FOLR1.

Muyldermans, S. (2013) *Annu. Ks. Biochem.* 82, 775-797 ujawnia nanociała: przeciwciała jednodomenowe i podkreśla jego zalety, w tym ich korzystne właściwości biochemiczne i ekonomiczne; powinowactwo wielkości, specyficzność, stabilność i koszty produkcji. Przeciwciała jednodomenowe (sdAb) różnią się od konwencjonalnych przeciwciał 4-łańcuchowych tym, że posiadają pojedynczą domenę zmienną przeciwciała monomerycznego. Na przykład wielbłądowate i rekiny produkują sdAbs zwane przeciwciałami zawierającymi tylko łańcuchy ciężkie (HcAbs), w których naturalnie brakuje łańcuchów lekkich. Fragment wiążący antygen w każdym ramieniu przeciwciała tylko z łańcuchem ciężkim wielbłądowatych ma pojedynczą domenę zmienną łańcucha ciężkiego (VHH), która może mieć wysokie powinowactwo do antygeny bez pomocy łańcucha lekkiego. VHH wielbłądowatych jest znany jako najmniejszy funkcjonalny fragment wiążący antygen o masie cząsteczkowej około 15 kD. Takie cząsteczki VHH mogą być wykorzystywane samodzielnie np. w różnych testach immunologicznych (zamiast scFv, IgG) lub służyć też służyć samodzielnie lub jako nośnik substancji aktywnej. Jednakże, jeden rodzaj fragmentu wiążącego antygen może nie być wystarczający dla zapewnienia skutecznej terapii nowotworów związanych z FOLR1. Z kolei dimeryzacja samych łańcuchów VHH obniża efektywność wiązania docelowego miejsca.

Niniejszy wynalazek rozwiązuje powyższe problemy poprzez dostarczenie dwóch różnych fragmentów VHH skierowanych przeciwko FOLR1, które wykazują aktywność przeciwnowotworową wobec linii komórkowych *in vitro* i *in vivo*. Takie fragmenty VHH pozwalają na odtworzenie pełnej długości przeciwciał z zastosowaniem fragmentu stałego łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał klasy IgG. Tak odtworzone przeciwciało zachowuje właściwości i siłę wiązania antygeny a dodatkowo wprowadzony łańcuch stały pozwala na wydajne otrzymanie heterodimerycznych przeciwciał. Ponadto, niniejszy wynalazek dostarcza sposób wytwarzania przeciwciała anty-FOLR1, koniugowania ich z cząsteczkami czynnymi farmakologicznie oraz kompozycję farmaceutyczną zawierającą takie przeciwciało lub oparty na nim koniugat.

Bardziej szczegółowo, przedmiotem wynalazku są sekwencje VHH będące zmodyfikowanym łańcuchem ciężkim pochodzącym z przeciwciał zwierząt z rodziny wielbłądowatych (Camelidae), do której należą m. in. wielbłądy i lamy (jak *Lama gama*). Przeciwciała tych zwierząt posiadają 2 rodzaje łańcuchów zmiennych: VH oraz VHH charakterystyczne dla podklasy przeciwciał IgG2 i IgG3 tej rodziny zwierząt. Charakteryzują się one zdolnością wiązania antygeny. W porównaniu z klasycznym fragmentem zmiennym łańcucha ciężkiego, posiadają wydłużoną domenę CDR3 oraz dodatkowy mostek dwusiarczkowy, który stabilizuje cząsteczkę. Fragmenty VHH mają liczne przewagi w porównaniu z powszechnie wykorzystywanymi jednołańcuchowymi fragmentami zmiennymi (single-chain fragment variable-scFv). Przede wszystkim bardzo uproszczona jest procedura i łatwość klonowania z różnych bibliotek: natywnych, syntetycznych czy bibliotek otrzymanych po immunizacji lam. VHH bardzo łatwo wyprodukować w bakteriach: w dużej ilości i formie rozpuszczalnej co ułatwia oczyszczanie i minimalizuje koszty produkcji. Cząsteczki VHH charakteryzują się ponadto wysoką stabilnością co ułatwia pracę z nimi a także wysokim i specyficznym wiązaniem do antygenów. Cząsteczki VHH mogą być wykorzystywane samodzielnie np. w różnych testach immunologicznych (zamiast scFv, IgG) lub służyć też służyć jako nośnik substancji aktywnej, co jest coraz powszechniej testowane np. w terapii nowotworów. Wyselekcjonowane fragmenty VHH pozwalają ponadto na odtworzenie pełnej długości przeciwciał z zastosowaniem np. łańcucha stałego z ludzkich przeciwciał klasy IgG, a zatem mogą służyć jako punkt wyjścia do przygotowania innej klasy cząsteczek z klasy przeciwciał. Przedmiotem wynalazku jest otrzymanie przeciwciał wiążących się do receptora FOLR1 w taki sposób, że do jednego z ramion fragmentu

stałego łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG dołączony jest pierwszy fragment VHH wiążący się do receptora FOLR1, a do drugiego ramienia wspomnianego łańcucha ciężkiego dołączony jest drugi fragment VHH wiążący się receptora FOLR1, przy czym wspomniane fragmenty VHH są różne od siebie. Dołączony fragment stały łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG ma wprowadzoną mutację pozwalającą na wydajne otrzymywanie heterodimerycznych przeciwciał. Otrzymane przeciwciała stanowią nośnik, do którego jest następnie koniugowana metodami chemicznymi cząsteczka cytostatyku. Otrzymany immunokoniugat jest wykorzystany w terapii nowotworów, które charakteryzują się nadekspresją receptora FOLR1. Tego typu nadekspresja jest charakterystyczna m. in. dla nowotworu jajnika.

W pierwszym aspekcie niniejszy wynalazek dostarcza:

pierwszy łańcuch VHH anty-FOLR1, zawierający region determinujący komplementarność (CDR) łańcucha VHH składający się z CDR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 1, CDR2 jak przedstawiono SEQ ID NO.: 2 i CDR3 jak przedstawiono SEQ ID NO.: 3.

W drugim aspekcie niniejszy wynalazek dostarcza

drugi łańcuch VHH anty-FOLR1, zawierający region determinujący komplementarność (CDR) łańcucha VHH składający się z CDR1, jak przedstawiono w SEQ ID NO: 4, CDR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO.: 5 i CDR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO.: 6.

Wspomniane CDR1, CDR2 i CDR3 są rozdzielone przez regiony zrębowe FR1, FR2, FR3 i FR4 łańcucha VHH, a wiązanie wspomnianego pierwszego i drugiego łańcucha VHH anty-FOLR1 może blokować wiązanie ligandów do FOLR1 i wywoływać cytotoksyczność komórkową.

Trzeci aspekt niniejszego wynalazku zapewnia pierwszy łańcuch VHH anty-FOLR1, a wspomniany łańcuch VHH zawiera region zrębowy (FR) i region determinujący komplementarność (CDR) według pierwszego aspektu, przy czym wspomniany region zrębowy składa się z FR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO:7, FR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 8, FR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 9 i FR4 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 11.

Czwarty aspekt niniejszego wynalazku zapewnia drugi łańcuch VHH anty-FOLR1, a wspomniany łańcuch VHH zawiera region zrębowy (FR) i region determinujący komplementarność (CDR) według drugiego aspektu, przy czym wspomniany region zrębowy składa się z FR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO:7, FR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 8, FR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 10 i FR4 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 11.

W korzystnej postaci wykonania pierwszy łańcuch VHH anty-FOLR1 ma sekwencję jak przedstawiono w SEQ ID NO.: 12.

W korzystnej postaci wykonania drugi łańcuch VHH anty-FOLR1 ma sekwencję jak przedstawiono w SEQ ID NO.: 13.

Piąty aspekt niniejszego wynalazku dostarcza pierwszy fragment przeciwciała anty-FOLR1, który jest skierowany przeciwko FOLR1 i zawiera pierwszy łańcuch VHH, jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 12, przy czym wspomniany pierwszy łańcuch VHH jest funkcjonalnie połączony z pierwszym fragmentem stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 14 i wspomniany pierwszy fragment przeciwciała jest jak przedstawiono w SEQ ID No: 16.

Szósty aspekt niniejszego wynalazku dostarcza drugi fragment przeciwciała anty-FOLR1, który jest skierowany przeciwko FOLR1 i zawiera drugi łańcuch VHH, jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 13, przy czym wspomniany drugi łańcuch VHH jest funkcjonalnie połączony z drugim fragmentem stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 15 i wspomniany drugi fragment przeciwciała jest jak przedstawiono w SEQ ID No: 17.

Siódmy aspekt niniejszego wynalazku dostarcza przeciwciała anty-FOLR1 złożone z fragmentów według piątego i szóstego aspektu wynalazku zwiniętych do postaci heterodimeru. Heterodimer przeciwciała anty FOLR1 składa się z pierwszego fragmentu przeciwciała przedstawionego przez SEQ ID NO: 16 i drugiego fragmentu przeciwciała przedstawionego przez SEQ ID NO: 17, połączonych do postaci heterodimeru dzięki mutacjom wprowadzonym w regionie Fc.

Ósmy aspekt niniejszego wynalazku dostarcza polinukleotydy, a wspomniane polinukleotydy kodują:

białka pierwszego fragmentu przeciwciała anty-FOLR1 według piątego aspektu niniejszego wynalazku jak przedstawiono w SEQ ID NO:21 i drugiego fragmentu przeciwciała anty-FOLR1 według szóstego aspektu niniejszego wynalazku jak przedstawiono w SEQ ID NO: 22;

białka pierwszego fragmentu stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 19 i drugiego fragmentu stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 20;
pierwszy łańcuch VHH anty-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 23;
drugi łańcuch VHH anty-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 24.

W pewnym korzystnym wykonaniu wspomniane polinukleotydy według ósmego aspektu wynalazku mają sekwencję nukleotydową jak przedstawiono w SEQ ID NO: 21 i SEQ ID NO.: 22.

W innej korzystnej postaci wykonania, wspomniane polinukleotydy są sekwencjami DNA.

Dziewiąty aspekt niniejszego wynalazku dostarcza wektor ekspresyjny, który to wektor ekspresyjny zawiera polinukleotydy według ósmego aspektu niniejszego wynalazku, w szczególności polinukleotydy według ósmego aspektu wynalazku, które mają sekwencję nukleotydową jak przedstawiono w SEQ ID NO: 21 i SEQ ID NO.: 22.

Dziesiąty aspekt niniejszego wynalazku zapewnia komórkę gospodarza, a wspomniana komórka gospodarza zawiera wektor ekspresyjny według dziewiątego aspektu niniejszego wynalazku albo polinukleotydy według ósmego aspektu niniejszego wynalazku zintegrowane z genomem komórki gospodarza.

W pewnej korzystnej postaci wykonania, wspomniana komórka gospodarza jest komórką *E. coli* albo komórką ssaczą.

Jedenasty aspekt niniejszego wynalazku zapewnia sposób wytwarzania przeciwciał anty-FOLR1 obejmujący etapy:

- (a) hodowanie wspomnianej komórki gospodarza jak określono w dziesiątym aspekcie niniejszego wynalazku w warunkach odpowiednich do wytwarzania przeciwciał, otrzymując w ten sposób hodowlę zawierającą wspomniane przeciwciała anty-FOLR1; oraz
- (b) wyizolowanie lub odzyskanie wspomnianych przeciwciał anty-FOLR1 ze wspomnianej hodowli.

W korzystnym wykonaniu, wspomniane przeciwciała anty-FOLR1 ma sekwencję aminokwasową określoną przez sekwencję pierwszego łańcucha heterodimeru SEQ ID NO: 16 i drugiego łańcucha heterodimeru SEQ ID NO.: 17.

Dwunasty aspekt niniejszego wynalazku dostarcza immunokoniugat, a wspomniany immunokoniugat zawiera:

- (a) przeciwciała anty-FOLR1 według siódmego aspektu niniejszego wynalazku; oraz
- (b) część sprzężoną wybraną z grupy składającej się z wykrywalnego markera, leku, toksyny, cytokiny, radionuklidu i enzymu.

W innym korzystnym wykonaniu, wspomnianą częścią sprzężoną jest lek lub toksyna.

W innej korzystnej postaci wykonania wspomniana część sprzężona jest wykrywalnym markerem.

W innym korzystnym wykonaniu, wspomniany koniugat jest wybrany z grupy składającej się z markerów fluorescencyjnych lub luminescencyjnych, radiomarkerów, środków kontrastowych MRI (obrazowania metodą rezonansu magnetycznego) lub CT (tomografii komputerowej) lub enzymów, radionuklidów, biotoksyn, cytokin (np. IL-2). itp.), przeciwciał, fragmentów Fc przeciwciał, fragmentów scFv przeciwciał, nanocząstek złota, cząstek wirusa, liposomów, cząstek nanomagnetycznych, enzymów aktywujących prolek (lub białko podobne do hydrolazy bifenyłowej (BPHL)), środków chemioterapeutycznych (np. cisplatyna, maitansynoidy, aurystatyna i jej pochodne jak Monometyloaurystatyna E (MMAE)) lub dowolnych postaci nanocząstek itp., które wytwarzają wykrywalne produkty.

Trzynasty aspekt wynalazku dostarcza przeciwciała anty-FOLR1 według siódmego aspektu niniejszego wynalazku do zastosowania jako (a) środek do wykrywania cząsteczki FOLR1; lub (b) lek do leczenia nowotworów.

W innym korzystnym wykonaniu, wspomniane wykrywanie obejmuje wykrywanie prowadzone za pomocą cytometrii przepływowej lub immunofluorescencji komórkowej.

Czternasty aspekt wynalazku dostarcza kompozycję farmaceutyczną zawierającą:

- (i) przeciwciała anty-FOLR1 według siódmego aspektu niniejszego wynalazku albo immunokoniugat według dwunastego aspektu niniejszego wynalazku; oraz
- (ii) farmaceutycznie dopuszczalny nośnik.

W innym korzystnym wykonaniu wspomniana kompozycja farmaceutyczna jest w postaci nadającej się do wstrzyknięć.

W innej korzystnej postaci wykonania, wspomniana kompozycja farmaceutyczna jest przeznaczona do stosowania w leczeniu raka, a wspomniany rak jest wybrany z grupy składającej się z raka jajnika, raka nerki, raka płuc, raka piersi.

Piętnasty aspekt niniejszego ujawnienia zapewnia jedno lub większą liczbę zastosowań przeciwciał anti-FOLR1 zgodnie z siódmym aspektem niniejszego wynalazku albo immunokoniugatu według dwunastego aspektu niniejszego wynalazku:

- (i) do wykrywania ludzkiej cząsteczki FOLR1;
- (ii) do testu cytometrii przepływowej;
- (iii) do wykrywania immunofluorescencji komórkowej;
- (iv) do leczenia raka;
- (v) do diagnozowania raka.

W innym korzystnym wykonaniu, wspomniane zastosowanie jest niediagnostyczne i nieterapeutyczne.

Szesnasty aspekt niniejszego wynalazku zapewnia zastosowanie przeciwciał anti-FOLR1 zgodnie z siódmym aspektem niniejszego wynalazku i/lub immunokoniugatu według dwunastego aspektu niniejszego wynalazku do przygotowania środka, płytki do wykrywania lub zestawu; przy czym wspomniany środek, płytkę lub zestaw do wykrywania stosuje się do wykrywania białka FOLR1 w badanej próbce. Ponadto, ujawnione jest zastosowanie przeciwciał anti-FOLR1 zgodnie z siódmym aspektem niniejszego wynalazku i/lub immunokoniugatu według dwunastego aspektu niniejszego wynalazku do przygotowania leku,

przy czym ten lek jest stosowany do leczenia lub profilaktyki nowotworów eksprymujących FOLR1 (tj. FOLR1-dodatnich).

W innej korzystnej postaci wykonania, wspomniany nowotwór obejmuje raka jajnika, raka nerki, raka płuc, raka piersi, najkorzystniej raka jajnika.

Krótki opis figur

Figura 1 przedstawia wyniki badań powinowactwa domeny VHH anti-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 12.

Figura 2 przedstawia wyniki badań powinowactwa domeny anti-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 13.

Opis szczegółowy

Przeciwciała anti-FOLR1 i oparte na nich koniugaty według wynalazku mogą skutecznie blokować oddziaływanie między FOLR1 i jego ligandami. Analiza BiaCore T200 pokazuje, że przeciwciała anti-FOLR1 charakteryzują się wysokim powinowactwem, doskonałą stabilnością i znaczącym działaniem hamującym nowotwory.

Stosowane tu określenia „przeciwciała według wynalazku”, „przeciwciała anti-FOLR1 według wynalazku” i „przeciwciała FOLR1 według niniejszego wynalazku” są zamienne i odnoszą się do przeciwciał, które specyficznie rozpoznają i wiążą się z FOLR1 L1 (w tym ludzkim FOLR1). Bardziej korzystne wspomniane przeciwciała anti-FOLR1 zgodnie z siódmym aspektem niniejszego wynalazku.

Stosowane tu określenie „przeciwciało” oznacza heterodimerskie przeciwciało wiążące się do receptorów FOLR1, w którym do pierwszego ramienia fragmentu stałego łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG dołączony jest pierwszy fragment VHH wiążący się do receptora FOLR1, a do drugiego ramienia łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG dołączony jest drugi fragment VHH wiążący się do receptora FOLR1, przy czym

fragmenty pierwszy i drugi łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG oraz fragmenty pierwszy i drugi VHH wiążącego się do receptora FOLR1 są różne od siebie, oraz

fragmenty pierwszy i drugi łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG mają wprowadzone mutacje pozwalające na wydajne otrzymywanie wspomnianego heterodimerskiego przeciwciała, tj. formowanie i zwijania do postaci heterodimerów w czasie ekspresji.

Stosowane tu określenie VHH odnosi się do regionu zmiennego łańcucha ciężkiego przeciwciała. Jest to najmniejszy fragment wiążący antygen o pełnej funkcji.

Stosowane tu określenie „zmienny” odnosi się do tego, że pewne części regionu zmiennego w przeciwciałach różnią się sekwencjami, co tworzy wiązanie i specyficzność różnych specyficznych przeciwciał z ich konkretnym antygenem. Jednakże, zmienność nie jest równomiernie rozłożona w całym regionie zmiennym przeciwciała. Jest skoncentrowana w trzech segmentach zwanych regionami

determinującymi komplementarność (CDR) lub regionami hiperzmiennymi w regionach zmiennych łańcucha lekkiego i ciężkiego. Bardziej konserwatywna część regionu zmiennego nazywana jest regionem zrębowym (FR). Każdy z regionów zmiennych naturalnych łańcuchów ciężkich i lekkich zawiera cztery regiony FR, które są zasadniczo w konfiguracji β -fałdowania, połączone trzema CDR, które tworzą pętlę łączącą, a w niektórych przypadkach mogą tworzyć częściowo β -pofałdowaną strukturę. Regiony CDR w każdym łańcuchu są blisko sąsiadujące z innymi regionami FR i tworzą miejsce wiązania antygeny przeciwciała z regionami CDR drugiego łańcucha (patrz Kabat i in., NIH Publ. nr 91-3242, tom I, strony 647-669. (1991)). Regiony stałe nie są bezpośrednio zaangażowane w wiązanie przeciwciała z antygenem, ale wykazują różne efekty lub funkcje, na przykład angażują się w zależną od przeciwciał cytotoxiczność przeciwciał.

Jak wiadomo specjalistom w dziedzinie, immunokoniugaty i produkty ekspresji fuzji obejmują: koniugaty utworzone przez wiązanie leków, toksyn, cytokin, radionuklidów, enzymów i innych cząsteczek diagnostycznych lub terapeutycznych z przeciwciałami lub ich fragmentami według niniejszego wynalazku. Ujawnienie obejmuje również marker powierzchniowy komórki lub antygen, który wiąże się ze wspomnianym przeciwciałem anty-FOLR1 lub jego fragmentem.

Stosowane tu określenie „region zmienny łańcucha ciężkiego” i „V_H” może być używany zamiennie.

Stosowane tu określenia „region zmienny” i „region determinujący komplementarność (CDR)” mogą być stosowane zamiennie.

Region zmienny łańcucha ciężkiego wspomnianego przeciwciała zawiera 3 regiony determinujące komplementarność: CDR1, CDR2 i CDR3.

W innej korzystnej postaci wykonania, łańcuch ciężki wspomnianego przeciwciała zawiera powyższy wspomniany region zmienny łańcucha ciężkiego i region stały łańcucha ciężkiego.

Zgodnie z niniejszym wynalazkiem, określenia „przeciwciała według wynalazku”, „białko według wynalazku” i „polipeptyd według wynalazku” są stosowane zamiennie i wszystkie odnoszą się do polipeptydu, takiego jak białko lub polipeptyd z regionem zmiennym łańcucha ciężkiego, który specyficznie wiąże się z białkiem FOLR1. Mogą, ale nie muszą zawierać metioniny startowej.

Wynalazek dostarcza również inne białka lub produkty ekspresji fuzji zawierające przeciwciała według wynalazku. W szczególności, niniejszy wynalazek obejmuje dowolne białko lub koniugat białkowy i produkt ekspresji fuzji (tj. immunokoniugat i produkt ekspresji fuzji) mający łańcuch ciężki zawierający region zmienny, o ile regiony zmienne są identyczne lub w co najmniej 90%, korzystnie co najmniej 95% identyczne z ciężkim łańcuchem przeciwciała według niniejszego wynalazku.

Ogólnie właściwości wiązania antygeny przeciwciała można opisać za pomocą trzech specyficznych regionów zlokalizowanych w regionie zmiennym łańcucha ciężkiego, określanym jako regiony zmienne (CDR), a segment jest podzielony na cztery regiony zrębowe (FR). Sekwencje aminokwasowe czterech FR są stosunkowo konserwatywne i nie uczestniczą bezpośrednio w reakcjach wiązania. Wspomniane CDR tworzą strukturę pętli, w której β -kartki utworzone przez FR pomiędzy nimi są przestrzennie blisko siebie, a CDR na łańcuchu ciężkim i CDR na odpowiednim łańcuchu lekkim stanowią miejsce wiązania antygeny przeciwciała. Sekwencje aminokwasowe tego samego typu przeciwciał można porównać w celu określenia, które aminokwasy tworzą regiony FR lub CDR.

Regiony zmienne łańcuchów ciężkich przeciwciał według wynalazku stają się przedmiotem szczególnego zainteresowania, ponieważ przynajmniej część z nich bierze udział w wiązaniu antygenów. Zatem, niniejsze ujawnienie obejmuje te cząsteczki, które mają region zmienny łańcucha ciężkiego w przeciwciałach z CDR, pod warunkiem, że ich CDR są w 90% lub powyżej (korzystnie 95% lub powyżej, najkorzystniej 98% lub powyżej) identyczne ze zidentyfikowanymi tutaj CDR.

Niniejszy wynalazek obejmuje nie tylko nienaruszone przeciwciała, ale także fragment(y) immunologicznie czynnego przeciwciała lub białka fuzyjnego utworzonego z przeciwciała z innymi sekwencjami. Dlatego niniejszy wynalazek obejmuje również fragmenty, pochodne i analogi przeciwciał, takie jak pojedyncze łańcuchy heterodimerskiego przeciwciała wg piątego i szóstego aspektu wynalazku.

Stosowane tu określenia „fragment”, „pochodna” i „analog” odnoszą się do polipeptydu, który zasadniczo zachowuje tę samą funkcję biologiczną lub aktywność przeciwciała według wynalazku. Fragmenty polipeptydowe, pochodne lub analogi według wynalazku mogą być (i) polipeptydami mającymi podstawioną jedną lub większą liczbę konserwatywnych lub niekonserwatywnych reszt aminokwasowych (korzystnie niekonserwatywnych reszt aminokwasowych). Takie podstawione reszty aminokwasowe mogą, ale nie muszą być kodowane przez kod genetyczny; lub (ii) polipeptyd zawierający grupę podstawnikową w jednej lub większej liczbie reszt aminokwasowych; lub (iii) polipeptyd utworzony przez

fuzję dojrzałego polipeptydu i innego związku (takiego jak związek, który zwiększa okres półtrwania polipeptydu, na przykład glikol polietylenowy); lub (iv) polipeptyd utworzony przez fuzję dodatkowej sekwencji aminokwasowej z sekwencją polipeptydową (np. sekwencja liderowa lub sekrecyjna lub sekwencja stosowana do oczyszczania tego polipeptydu lub sekwencja probiałka lub białko fuzyjne utworzone ze znacznikiem 6xHis). Zgodnie z niniejszymi instrukcjami, te fragmenty, pochodne i analogi mieszczą się w zakresie przeciętnego specjalisty w dziedzinie.

Przeciwciało według niniejszego wynalazku odnosi się do polipeptydu zawierającego powyższe regiony CDR wykazujące aktywność wiązania białka FOLR1. Określenie obejmuje również warianty postaci polipeptydów zawierających powyższe regiony CDR, które pełnią taką samą funkcję jak przeciwciała według wynalazku. Zmiany te obejmują między innymi insercje delecyjne i/lub substytucje jednego lub kilku (zwykle 1-50, korzystnie 1-30, korzystniej 1-20, optymalnie 1-10) aminokwasów oraz dodanie jednego lub kilku (zwykle mniej niż 20, korzystnie mniej niż 10, a korzystniej mniej niż 5) aminokwasów na C-końcu i/lub N-końcu. Na przykład, w dziedzinie, podstawienie aminokwasów o analogicznych lub podobnych właściwościach zwykle nie zmienia funkcji białka. Dla innego przykładu dodanie jednego lub kilku aminokwasów na C-końcu i/lub N-końcu zwykle nie zmienia funkcji białka. Określenie obejmuje również aktywne fragmenty i aktywne pochodne przeciwciał według wynalazku.

Warianty postaci polipeptydu obejmują: sekwencje homologiczne, warianty konserwatywne, warianty alleliczne, mutanty naturalne, mutanty indukowane, białka kodowane przez DNA zdolne do hybrydyzacji z DNA kodującym przeciwciało według niniejszego wynalazku w warunkach ostrych lub łagodnych oraz polipeptydy lub białka otrzymane przy użyciu surowicy odpornościowej przeciwko przeciwciałom według wynalazku.

Wynalazek dostarcza również inne polipeptydy, takie jak białko fuzyjne zawierające przeciwciała lub ich fragmenty. Oprócz polipeptydów o prawie pełnej długości, niniejszy wynalazek obejmuje również fragmenty przeciwciał według wynalazku. Zazwyczaj fragment zawiera co najmniej około 50 sąsiadujących aminokwasów przeciwciała według wynalazku, korzystnie co najmniej około 50 sąsiadujących aminokwasów, korzystniej co najmniej około 80 sąsiadujących aminokwasów, a najkorzystniej co najmniej około 100 sąsiadujących aminokwasów.

W niniejszym wynalazku „konserwatywny wariant przeciwciała według niniejszego wynalazku” odnosi się do polipeptydów, w których jest do 10, korzystnie do 8, korzystniej do 5, a najkorzystniej do 3 aminokwasów podstawionych aminokwasami o właściwościach analogicznych lub podobnych w porównaniu z sekwencją aminokwasową przeciwciała według niniejszego wynalazku. Te konserwatywne warianty polipeptydów są korzystnie wytwarzane zgodnie z podstawieniami aminokwasów w Tabeli 1.

Tabela 1

Reszta oryginalna	Przykładowa substytucja	Korzystna substytucja
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

Niniejszy wynalazek dostarcza również cząsteczkę polinukleotydową kodującą powyższe przeciwciało lub jego fragment lub białko fuzyjne. Polinukleotydy wg wynalazku mogą mieć postać DNA lub RNA. Formy DNA obejmują cDNA, genomowy DNA lub syntetyczny DNA. DNA może być jednoniciowy lub dwuniciowy. DNA może być nicią kodującą lub nicią niekodującą.

Polinukleotydy kodujące dojrzałe polipeptydy według wynalazku obejmują: sekwencje kodujące tylko kodujące dojrzały polipeptyd; sekwencje kodujące dojrzały polipeptyd i różne dodatkowe sekwencje kodujące; sekwencje kodujące (i opcjonalne dodatkowe sekwencje kodujące) i sekwencje niekodujące dojrzałego polipeptydu.

Określenie „polinukleotyd kodujący polipeptyd” może obejmować polinukleotyd, który koduje polipeptyd, a także może obejmować polinukleotyd, który zawiera dodatkowe sekwencje kodujące i/lub niekodujące.

Wynalazek dotyczy także polinukleotydów, które hybrydują z sekwencjami opisanymi powyżej i które wykazują co najmniej 50%, korzystnie co najmniej 70%, a korzystnie co najmniej 80% identyczności między dwiema sekwencjami. Niniejszy wynalazek w szczególności dotyczy polinukleotydów, które mogą być hybrydyzowane z polinukleotydami według niniejszego wynalazku w warunkach ostrych. W niniejszym wynalazku „warunki ostre” odnoszą się do: (1) hybrydyzacji i elucji przy niższej sile jonowej i wyższej temperaturze, takiej jak 0,2 x SSC, 0,1% SDS, 60°C; lub (2) dodatkowe środki denaturujące podczas hybrydyzacji, takie jak 50% (obj./obj.) formamid, 0,1% płodowa surowica bydlęca/0,1% Ficoll, 42°C, itd.; lub (3) hybrydyzacja zachodzi tylko przy identyczności między dwiema sekwencjami co najmniej ponad 90%, korzystnie ponad 95%. Ponadto polipeptydy kodowane przez podlegające hybrydyzacji polinukleotydy mają te same funkcje biologiczne i aktywności, co dojrzałe polipeptydy.

Sekwencję nukleotydową pełnej długości przeciwciała według niniejszego wynalazku lub jego fragment można ogólnie uzyskać metodą amplifikacji PCR, metodą rekombinacji lub metodą sztucznej syntezy. Jedną z możliwych metod jest synteza pokrewnych sekwencji przy użyciu metod syntetycznych, zwłaszcza gdy długość fragmentu jest krótka. Ogólnie rzecz biorąc, długą sekwencję fragmentów można uzyskać, najpierw syntetyzując wiele małych fragmentów, a następnie łącząc je. Ponadto sekwencja kodująca łańcucha ciężkiego i znacznik ekspresyjny (np. 6xHis) mogą być połączone razem w celu utworzenia białka fuzyjnego.

Po uzyskaniu odpowiednich sekwencji, dane sekwencje można uzyskać na dużą skalę przy użyciu metod rekombinacji. Zwykle sekwencje można uzyskać przez klonowanie ich do wektora, przeniesienie do komórek, a następnie izolowanie sekwencji z proliferujących komórek gospodarza konwencjonalnymi metodami. Biocząsteczki (kwasy nukleinowe, białka itp.), do których odnosi się niniejszy wynalazek, obejmują biocząsteczki, które istnieją w postaci wyizolowanej.

Obecnie sekwencje DNA kodujące białko według niniejszego wynalazku (lub jego fragment lub jego pochodną) można uzyskać całkowicie drogą syntezy chemicznej. Sekwencja DNA może być następnie wprowadzona do różnych istniejących cząsteczek DNA (lub np. wektorów) i komórek znanych w dziedzinie. Ponadto mutacje można również wprowadzić do sekwencji białkowych według wynalazku na drodze syntezy chemicznej.

Wynalazek dotyczy również wektorów zawierających wyżej wymienione odpowiednie sekwencje DNA i odpowiednie promotory lub sekwencje kontrolne. Wektory te można wykorzystać do transformacji odpowiedniej komórki gospodarza, aby mogła ona ekspresjonować białko.

Komórka gospodarza może być komórką prokariotyczną, taką jak komórka bakteryjna; lub niższą komórkę eukariotyczną, taką jak komórka drożdży; lub wyższą komórkę eukariotyczną, taką jak komórka ssaka. Reprezentatywne przykłady to: *Escherichia coli*, *Streptomyces*, komórki bakteryjne, takie jak *Salmonella typhimurium*, komórki grzybów, takie jak drożdże, komórki owadów *Drosophila* S2 lub Sf9, komórki zwierzęce CHO, COS7, komórki 293 i tym podobne.

Transformację komórki gospodarza rekombinowanym DNA można przeprowadzić przy użyciu konwencjonalnych technik dobrze znanych specjalistom w dziedzinie. Gdy gospodarzem jest organizm prokariotyczny, taki jak *E. coli*, kompetentne komórki zdolne do przyjmowania DNA można zebrać po fazie wzrostu wykładniczego i traktować metodą CaCl_2 . Stosowane procedury są dobrze znane w dziedzinie. Inną metodą jest użycie MgCl_2 . W razie potrzeby można również zastosować elektroporację. Gdy gospodarz jest eukariotyczny, można zastosować następujące metody transfekcji DNA: koprecypitacja fosforanem wapnia, konwencjonalne metody mechaniczne, takie jak mikroiniekcja, elektroporacja, pakowanie liposomów i tym podobne.

Otrzymane transformanty można hodować w konwencjonalny sposób w celu ekspresji polipeptydu kodowanego przez gen według niniejszego wynalazku. W zależności od użytych komórek gospodarza, pożywkę stosowaną w hodowli można wybrać spośród różnych konwencjonalnych pożywek. Hodowlę prowadzi się w warunkach odpowiednich dla wzrostu komórek gospodarza. Po wyhodowaniu komórek gospodarza do odpowiedniej gęstości komórek, wybrany promotor jest indukowany odpowiednią metodą (taką jak zmiana temperatury lub indukcja chemiczna) i komórki są inkubowane przez dalszy okres czasu.

Rekombinowany polipeptyd w powyższym sposobie może być ekspresjonowany wewnątrzkomórkowo lub na błonie komórkowej lub wydzielany pozakomórkowo. W razie potrzeby zrekombinowane białko można wyizolować i oczyścić różnymi metodami rozdzielania, wykorzystując jego właściwości fizyczne, chemiczne i inne. Metody te są dobrze znane specjalistom w dziedzinie. Przykłady tych metod obejmują między innymi: konwencjonalną obróbkę renaturacyjną, obróbkę środkiem strącającym białka

(metoda wysalania), wirowanie, rozerwanie osmotyczne, ultra wirowanie, chromatografię sit molekularnych (filtracja żelowa), chromatografię jonowymienną, wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) i różne inne techniki chromatografii cieczowej oraz ich kombinacje.

Przeciwciała według wynalazku można stosować jako takie albo w połączeniu lub sprzężone z wykrywalnym markerem (do celów diagnostycznych), środkiem terapeutycznym, ugrupowaniem modyfikującym PK (kinaza białkowa) lub ich kombinacją.

Wykrywalne markery do celów diagnostycznych obejmują między innymi: markery fluorescencyjne lub luminescencyjne, markery radioaktywne, środki kontrastowe MRI (obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego) lub CT (tomografia komputerowa) lub enzymy zdolne do wytwarzania wykrywalnych produktów.

Środki terapeutyczne, które mogą być wiązane lub skoniugowane z przeciwciałami według niniejszego wynalazku obejmują, ale nie wyłącznie: 1. Radionuklidy; 2. Trucizny biologiczne; 3. Cytokiny, takie jak IL-2, itd.; 4. nanocząstki złota; 5. Cząstki wirusów; 6. Liposomy; 7. Cząstki nanomagnetyczne; 8. Enzymy aktywujące proleki (na przykład diaforaza DT (DTD) lub białko podobne do hydrolazy bifenylowej (BPHL)); 10. Środki chemioterapeutyczne (na przykład cisplatyna, maitansynoidy, aurystatyna i jej pochodne) itp., korzystnie Monometyloaurystatyna E (MMAE).

Kompozycja farmaceutyczna

Wynalazek dostarcza również kompozycję. Wspomniana kompozycja jest kompozycją farmaceutyczną zawierającą powyższe przeciwciało lub jego aktywny fragment lub białko fuzyjne albo immunokoniugat utworzony na ich bazie oraz farmaceutycznie dopuszczalny nośnik. Ogólnie rzecz biorąc, materiały te można formułować w nietoksycznych, obojętnych i farmaceutycznie dopuszczalnych nośnikach wodnych, w których pH wynosi na ogół około 5-8, korzystnie około 6-8, chociaż pH może się zmieniać w zależności od charakteru materiału do formulacji i stanu, który ma być leczony. Sformułowane kompozycje farmaceutyczne można podawać konwencjonalnymi drogami obejmującymi, ale nie wyłącznie, podawanie do guza, dootrzewnowe, dożylnie lub miejscowe.

Kompozycja farmaceutyczna według niniejszego wynalazku może być bezpośrednio stosowana do leczenia nowotworów. Ponadto można jednocześnie stosować inne środki terapeutyczne.

Kompozycja farmaceutyczna według niniejszego wynalazku zawiera bezpieczną i skuteczną ilość (na przykład 0,001–99% wag., korzystnie 0,01–90% wag., a korzystniej 0,1–80% wag.) wyżej wymienionych przeciwciał według niniejszego wynalazku (lub ich koniugatów) oraz farmaceutycznie dopuszczalne nośniki lub zarobki. Takie nośniki obejmują, ale nie wyłącznie: sól fizjologiczną, bufor, dekstrozę, wodę, glicerol, etanol i ich kombinacje. Kompozycja leku powinna być odpowiednia do sposobu podawania. Kompozycję farmaceutyczną według niniejszego wynalazku można wytwarzać w postaci iniekcji, na przykład konwencjonalną metodą z użyciem soli fizjologicznej lub wodnego roztworu zawierającego glukozę i inny adiuwant. Kompozycje farmaceutyczne, takie jak zastrzyki i roztwory, korzystnie wytwarza się w warunkach aseptycznych. Ilość podawanego składnika aktywnego jest ilością terapeutycznie skuteczną, na przykład około 10 mikrogramów/kilogram masy ciała do około 50 miligramów/kilogram masy ciała na dzień. Ponadto, polipeptydy według wynalazku można również stosować z innymi środkami terapeutycznymi.

Gdy stosuje się kompozycję farmaceutyczną, ssakowi podaje się bezpieczną i skuteczną ilość immunokoniugatu, przy czym bezpieczna i skuteczna ilość wynosi zwykle co najmniej około 5-10 mikrogramów/kilogram masy ciała, a w większości przypadków nie więcej niż około 50 mg/kilogram masy ciała, korzystnie dawka wynosi około 10 mikrogramów/kilogram masy ciała do około 10 miligramów/kilogram masy ciała. Oczywiście, aby określić konkretne dawki, należy wziąć pod uwagę takie czynniki, jak droga podawania i stan zdrowia pacjenta, z których wszystkie mieszczą się w zakresie umiejętności wykwalifikowanych lekarzy.

Przeciwciała według wynalazku odróżniają się od stanu techniki w dziedzinie przeciwciał anty-FOLR1, tym, że

- (a) przeciwciała według wynalazku są białkami anty-FOLR1 o wysokiej specyficzności dla ludzi i prawidłowej strukturze przestrzennej;
- (b) przeciwciała według wynalazku mają silne powinowactwo; oraz
- (c) przeciwciała według wynalazku są wytwarzane prostym sposobem.

Niniejszy wynalazek jest dalej opisany w połączeniu z określonymi przykładami wykonania. Należy rozumieć, że te przykłady służą jedynie do zilustrowania niniejszego wynalazku i nie mają na celu ograniczenia zakresu niniejszego wynalazku. Metody eksperymentalne, które nie określają konkretnych

warunków w poniższych przykładach, są na ogół wykonywane zgodnie z konwencjonalnymi warunkami, takimi jak te opisane w Sambrook i wsp., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nowy Jork: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) lub zgodnie z warunkami zalecanymi przez producenta. O ile nie wskazano inaczej, procenty i części są procentami wagowymi i częściami wagowymi.

Przykłady wykonania wynalazku

Przykład 1: Ekspresja i oczyszczanie receptora FOLR1 w ssaczym systemie ekspresyjnym

Klonowanie i oczyszczanie plazmidów

Sekwencja nukleotydowa kodująca receptor FOLR1 została zoptymalizowana pod kątem wydajnej ekspresji w komórkach ludzkich z wykorzystaniem znanego w dziedzinie algorytmu Gene Art (Thermo Scientific). Sekwencje w/w receptora w fuzji z fragmentem Fc przeciwciała (SEQ ID NO: 18), zostały wklonowane do plazmidu pSF2. Zastosowano sekwencję receptora FOLR1 wg UniProtKB/Swiss-Prot: P15328.3 aminokwasy 25-234 odpowiadające dojrziałemu łańcuchowi receptora FOLR1.

Poprawność wklonowanych sekwencji nukleotydowych kodujących zewnątrzkomórkowe fragmenty receptorów do właściwych plazmidów została potwierdzona sekwencjonowaniem. Właściwe konstrukty zostały namnożone w bakteriach *E. coli* szczepu DH5 α i oczyszczone za pomocą kitu Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Maxi Plus EF zgodnie z instrukcjami producenta. Finalne preparaty zostały dodatkowo przefiltrowane sterylnie przez filtr 0,22 μ m.

Transfekcja

Komórki Expi293F™ były hodowane w standardowych warunkach zgodnie z protokołem dostawcy (37°C, 8% CO₂, 100 obr/min). Do transfekcji użyto odpowiednio 7,5 x 10⁷ komórek w 25,5 ml Expi293F™ Expression Medium (mała skala) lub 14,5 x 10⁸ komórek w 425 ml pożywki w przypadku dużej skali produkcji. Komórki hodowano w 125 ml sterylnych, jednorazowych kolbach Erlenmeyera. Kompleksy lipidy-DNA odpowiednio na 30 ml lub 500 ml transfekcji zostały otrzymane w następujący sposób:

- a) Odpowiednio 30 μ g lub 500 μ g plazmidu zostało rozcieńczone Opti-MEM® I Reduced Serum Medium w końcowej objętości odpowiednio 1,5 ml lub 25 ml, mieszane delikatnie i inkubowane 5 min.
- b) Odpowiednio 80 μ l lub 1350 μ l ExpiFectamine™ 293 Reagent zostało rozcieńczone Opti-MEM™ I medium w końcowej objętości odpowiednio 1,5 ml lub 25 ml, delikatnie zmieszane i inkubowane 5 min.

Po 5 min inkubacji rozcieńczone DNA zostało dodane do rozcieńczonego ExpiFectamine™ 293 Reagent, mieszane delikatnie i inkubowane dalej w celu utworzenia się kompleksów DNA-ExpiFectamine™ 293 Reagent. Wytworzone kompleksy zostały dodane do komórek i inkubowane 18 godzin w w/w warunkach ze zwiększonym do 140 obr/min wytrząsaniem. Po tym czasie dodano wzmacniaczy transfekcji zgodnie z protokołem producenta. W celu sprawdzenia wydajności produkcji białek z hodowli pobrano próbki po 200 μ l dnia 2, 3, 4 i 5. Próbki żwirowano w celu odseparowania komórek od pożywki. Obie frakcje zostały zamrożone w -20°C do dalszej analizy. W celu weryfikacji obecności białka, poszczególne frakcje zostały przeanalizowane z wykorzystaniem elektroforezy SDS-PAGE. Próbki białkowe zostały rozdzielone na 4–20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel i wybarwione.

Oczyszczanie białek

Nadeksprymowany w komórkach Expi293F™ receptor FOLR1 zostały następnie oczyszczony.

Oczyszczanie białek w małej skali

Oczyszczanie nadeksprymowanego receptora w małej skali przeprowadzono na pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie z białkiem A zgodnie z instrukcjami producenta kolumny. Oczyszczanie białek z pożywki pohodowlanej prowadzono w 4°C. Białko po elucji TEA (trietyloaminą) zostało zneutralizowane buforem o pH 8,0 i zagęszczane na Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit z membraną 10 kDa (Merck), a następnie wymieniono bufor poprzez dializę wobec 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl i 10% glycerol, pH 7,5.

Oczyszczanie białek w dużej skali

Oczyszczanie nadeksprimowanego receptora w dużej skali przeprowadzono dwuetapowo: za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie HisTrap™ Ni NTA 5 ml (GE Healthcare), a następnie tak jak poprzednio z wykorzystaniem powinowactwa do białka A. Białka po związaniu do kolumny zostały przepłukane buforem zawierającym: 50 mM TrisHCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 30 mM imidazol. Związane z kolumną białka wyeluowano tym samym buforem zawierającym wzrastające gradientowo stężenie imidazolu (50 – 300 mM). Oczyszczone białko zostało zagęszczone na Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit z membraną 10 kDa (Merck) a następnie wymieniono bufor poprzez dializę wobec 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl i 10% glicerol, pH 7,5. Wstępnie oczyszczone białko zostało finalnie oczyszczone na białku A tak, jak to uprzednio opisane. Stężenie zostało zmierzona metodą Bradford.

Odcinanie fragmentu Fc i uzyskanie czystego receptora

W celu usunięcia fragmentu Fc z białka fuzyjnego i uzyskania czystych, rozpuszczalnych receptorów, wykorzystano trawienie protezą TEV. Mieszanina reakcyjna została nałożona na kolumnę z białkiem A, a następnie na kolumnę SEC lub oczyszczona na kolumnie niklowej, aby pozbyć się odtrawionego fragmentu Fc oraz niestrawionego, pełnej długości białka fuzyjnego. Stężenie uzyskanego receptora zostało zmierzone metodą Bradford i po deglikozylacji wysłane na analizę LC-ESI-MS w celu potwierdzenia masy.

Immunizacja lam

2 lamy (Lama gama) były immunizowane oczyszczonym białkiem nie zawierającym fragmentu Fc-FOLR1. Zwierzęta były immunizowane 4-krotnie, dnia 0, 14, 28 i 35. Po tygodniu od ostatniej immunizacji od zwierząt pobrano krew i wyizolowano RNA.

Odpowiedź poszczepienną badano testem immunoenzymatycznym ELISA. W tym celu płytkę 96- dołkową odpowiadającym antygenem i inkubowano przez noc w 4°C. Aby zminimalizować niespecyficzne wiązanie i zablokować wolne miejsca płytkę inkubowano z 4% mlekiem a następnie nałożono seryjne rozcieńczenia surowic. Po godzinie odpłukano niezwiązane przeciwciała, a związane VHH wykrywano przeciwciałami anty VHH a następnie dodawano przeciwciała anty królicze wyznakowane peroksydazą chrzanową. Wiązanie VHH do właściwego antygeny określono ilościowo poprzez wytworzenie reakcji barwnej o-fenylendiaminy w obecności H₂O₂ odczytanej przy długości fali 490 nm.

Przykład 2: Konstrukcja biblioteki fragmentów zmiennych przeciwciał anty-FOLR1

Przygotowanie biblioteki fagowej

Próbki krwi do izolacji RNA zostały pobrane 43 dnia od pierwszej immunizacji lam. W celu sprawdzenia integralności RNA próbki zostały nałożone na żel agarozowy. 40 µg oczyszczonego RNA zostało przepisane na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy firmy Invitrogen. Zsyntetyzowane cDNA zostało oczyszczone za pomocą zestawu PCR clean-up (Macherey-Nagel). Łańcuchy ciężkie (normalne i ciężkie) przeciwciał zostały zaamplifikowane z użyciem starterów wiążących się do sekwencji liderowej i regionu CH2. Analiza reakcji na 1% żelu agarozowym potwierdziła obecność 2 prążków o wielkości około 700 pz oraz około 900 pz reprezentujących oba rodzaje łańcuchów ciężkich: VHH oraz VH. Odpowiedni prążek (700 pz) został następnie wycięty z żelu agarozowego i oczyszczony. 80 ul zostało użytych jako matryca w tzw. wewnętrznym PCR. Produkt PCR oczyszczono i strawiono enzymem *SfiI* a następnie *BstEII* w celu uzyskania produktu o wielkości 400 pz widocznego na żelu agarozowym. Uzyskany prążek był ponownie wycięty z żelu, oczyszczony a następnie wklonowany do wektora fagemidu pUR8100 i wtransformowany do bakterii *E. coli* szczepu TG1. Transformanty TG1 zostały zmierzczowane używając 10-krotnych rozcieńczeń i nakropione na płytce z LB agarem suplementowanym ampicyliną (100 µg/ml) oraz 2% glukozą. Miano otrzymanej biblioteki fagowej zostało obliczone uwzględniając jej objętość, ilość otrzymanych kolonii oraz rozcieńczenie. Wielkość otrzymanych bibliotek dla wszystkich testowanych receptorów mieściła się w zakresie między $1,44 \times 10^8$ a $4,8 \times 10^8$. Każda z przygotowanych bibliotek została sprawdzona w celu potwierdzenia częstości występowania wstawek. Analiza PCR 24 klonów z każdej z nich potwierdziła, obecność wstawek we wszystkich testowanych klonach. Tylko w przypadku jednej z dwóch bibliotek przygotowanych na receptor FOLR1, częstość występowania wstawki wynosiła >90%.

Selekcja VHH wiążących się do receptora FOLR1 za pomocą techniki Phage Display

Bakterie *E. coli* szczepu TG1 zawierające odpowiednią bibliotekę były rozcieńczone do $OD_{600} = 0,05$ w pożywce 2xTY zawierającej 2% glukozę i 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicyliny hodowano 2 h w temperaturze 37°C do $OD_{600} 0.5$. Następnie 7 ml hodowli zostało zainfekowanych fagiem pomocniczym VCS M13 używając MOI (multiplicity of infection) = 100 przez 30 min w temperaturze 37°C. Bakterie zostały następnie zwirowane i zawieszone w świeżej pożywce 2xTY z dodatkiem ampicyliny (100 $\mu\text{g/ml}$) i kanamycyny (25 $\mu\text{g/ml}$) i hodowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem. Namnożone fagi zostały następnie wyprecypitowane z supernatantu roztworem PEG-NaCl. Miano fagów obliczono infekując bakterie TG1 seryjnymi rozcieńczeniami fagów.

Przykład 3: Badanie przesiewowe, selekcja fagów i weryfikacja VHH anty-FOLR1

Dla analizowanej biblioteki opłaszczono płytkę MaxiSorp inkubując przez noc z odpowiednim antygenem FOLR1-Fc w 2 stężeniach 5 $\mu\text{g/ml}$ oraz 0,5 $\mu\text{g/ml}$ lub PBS jako kontrolą negatywną. Po odpłukaniu niezwiązanych antygenów, płytka została zablokowana 4% roztworem odtłuszczonego mleka. Jednocześnie 20 μl przetrąconych fagów ($\sim 10^{11}$ fagów stanowiących ponad 1000-krotność różnorodności biblioteki) zostało wstępnie zablokowanych poprzez 30 min inkubację z 2% roztworem odtłuszczonego mleka. Tak przygotowane fagi inkubowane 2 h z opłaszczonym na płytce odpowiednim antygenem. Po intensywnym płukaniu roztworem PBST związane fagi wyeluowano 0,1M buforem TEA i natychmiast zneutralizowano 1M TRIS/HCl o pH 7,5. Wyeluowane fagi zmiareczkowano infekując seryjnymi rozcieńczeniami bakterie TG1 a następnie wysiewając na płytkę suplementowaną 2% glukozą i ampicyliną (100 $\mu\text{g/ml}$).

Uzyskane w czasie selekcji fagi zostały użyte do infekcji bakterii TG1 i zabezpieczone w -80°C jako stoki glicerolowe. Jednocześnie eluaty z dołków opłaszczonych większym stężeniem antygenów namnożono do II rundy selekcji. Nocną hodowlę TG1 zainfekowaną fagami rozcieńczono 100-krotnie w 5 ml świeżej pożywki 2xYT suplementowanej 2% glukozą i ampicyliną (100 $\mu\text{g/ml}$) i hodowano do osiągnięcia fazy logarytmicznej. Następnie dodano 1 μl fagów pomocniczych i inkubowano przez 30 min w temperaturze 37°C. Namnożone fagi wyprecypitowano roztworem PEG-NaCl.

1 μl uzyskanych w pierwszej rundzie selekcji a następnie namnożonych fagów użyto do 2 rundy selekcji używając tym razem płytki opłaszczonej 3 stężeniami antygeny: 5 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ oraz 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Następnie kroki procedury były takie same jak w rundzie pierwszej.

Analogicznie przeprowadzono także 3 rundę selekcji fagów. Uzyskane klony, otrzymane we frakcji periplazmatycznej zostały przetestowane w teście ELISA. W tym celu pojedyncze klony zostały zaszczipione w duplikatach na 96-głębokodołkowej płytce zawierającej 1 ml pożywki 2xYT z 0,1% glukozy ampicyliną (100 $\mu\text{g/ml}$) i hodowano 3 h w 37°C. Następnie dodano 1 mM IPTG i kontynuowano hodowlę przez noc w temperaturze pokojowej. Rano, hodowla została zwirowana, zawieszona w PBS, zamrożona i rozmrożona w celu izolacji frakcji periplazmatycznej i odwirowana aby pozbyć się błon i resztek komórkowych.

Aby potwierdzić wiązanie frakcji periplazmatycznych VHH do danego receptora, płytka MaxiSorp została opłaszczona przez noc 100 ng/ml danego antygeny, zablokowana 4% odtłuszczonego mlekiem a następnie do tak przygotowanej płytki dodano po 10 μl frakcji periplazmatycznych zawierających poszczególne monoklonalne VHH i inkubowano 1 h z 1% odtłuszczonego mlekiem. Związane VHH były następnie wykrywane króliczymi przeciwciałami anty VHH a następnie anty króliczymi skoniugowanymi z peroksydazą. Wiązanie VHH było zmierzone ilościowo poprzez kolorymetryczną reakcję OPD w obecności H_2O_2 i zmierzone przy długości fali 490 nm.

Table 1. Purified VHHs directed against FolR

VHH	Vector	Tag	lot number	CF	MW (Da)	A280	Conc. (mg/ml)	Conc. (μM)	Amount Delivered (ml)
AFR-162	pMEK222	FLAG-His	180906LvR	1.462	14741	1.294	0.885	60.03	0.6
AFR-1A8	pMEK222	FLAG-His	180906LvR	1.312	15292	2.634	2.007	131.27	0.25
AFR-1D9	pMEK222	FLAG-His	180906LvR	1.557	14798	4.182	2.585	181.47	0.19
AFR-1C12	pMEK222	FLAG-His	180906LvR	1.995	15055	5.786	2.900	192.64	0.18

Pozytywne klony zsekwencjonowano aby potwierdzić ich różnorodność. Dla każdego antygeny uzyskano przynajmniej 10 różnych sekwencji należących do 2 różnych grup (germline families): KQREL lub KREF.

Z otrzymanych sekwencji VHH wiążących się do receptora FOLR1 do dalszej analizy wybrano następujące VHH wiążące się do FOLR1:

AFR-1G2 o sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 12

AFR-1D9 o sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 13

Przykład 4: Otrzymywanie przeciwciała według wynalazku:

Synteza genów i uzyskanie konstruktów umożliwiających uzyskanie fragmentów zmiennych przeciwciał z lam w bakteryjnym systemie ekspresyjnym.

Sekwencje aminokwasowe wybranych, najbardziej obiecujących fragmentów VHH specyficznych wobec receptora FOLR1 zostały wykorzystane do wykonania konstruktów pozwalających na wydajną ekspresję w bakteriiach *E. coli* oraz umożliwiających ich oczyszczanie na żywicy niklowej.

Sekwencje nukleotydowe kodujące geny VHH z HIS-tag zostały zsyntetyzowane przez firmę Eurofins. Geny kodujące VHH zostały zoptymalizowane pod kątem wydajnej ekspresji w bakteriiach. Wszystkie geny zostały zsyntetyzowane w dwóch wariantach: z sekwencją sygnałną umożliwiającą ekspresję białka i jej wydajny eksport do przestrzeni periplazmatycznej oraz bez sekwencji sygnałnej pozwalający na ekspresję białka w cytoplazmie. Uzyskane geny były strawione za pomocą enzymów restrykcyjnych NdeI i XhoI a następnie wligowane do wektora ekspresyjnego pET30a przygotowanego w ten sam sposób. Poprawność finalnych konstruktów potwierdzono za pomocą sekwencjonowania metoda Sanger.

Optymalizacja produkcji VHH w *E. coli*

Uzyskane plazmidy zostały wtransformowane za pomocą transformacji chemicznej do różnych, w przygotowanych uprzednio szczepów *E. coli* w celu optymalizacji produkcji wariantów VHH. Testowane były następujące szczepy:

Tabela 2

Szczep <i>E.coli</i>	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁻ Tct ^t <i>gal</i> □(DE3) <i>endA</i> Htc [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r]
SHuffle® T7 Express lysY	MiniF <i>lysY</i> (Cam ^R) / <i>fhuA2</i> <i>lacZ</i> ::T7 <i>gene1</i> [lon] <i>ompT</i> <i>ahpC</i> <i>gal</i> λ att::pNEB3-r1- <i>cDsbC</i> (Spec ^R , lacI ^q) <i>AtrxB</i> <i>sulA11</i> <i>R</i> (<i>mcr-73::miniTn10--Tet^S</i>)2 [dcm] <i>R</i> (<i>zgb-210::Tn10 --Tet^S</i>) <i>endA1</i> Δ gor Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10
Single Step (KRX)	[F', traD36, Δ ompP, proA+B ⁺ , lacI ^q , Δ (lacZ)M15] Δ ompT, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^r), thi-1, <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), e14 ⁻ (McrA ⁻), <i>relA1</i> , supE44, Δ (lac-proAB), Δ (<i>rhaBAD</i>)::T7 RNA polymerase.

10 ml pożywki TB suplementowanej kanamycyną o końcowym stężeniu 50 µg/ml zostało zaszczipione nocną hodowłą bakteryjną w stosunku 1:100 (hodowla z pojedynczej kolonii z transformacji wykonanej poprzedniego dnia) i hodowano do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀ = 0,6-0,8 w temperaturze 37°C lub 30°C, z wytrząsaniem 200 obr./min. Tak przygotowano hodowlę dla każdego analizowanego warunku optymalizacji. Po uzyskaniu spodziewanej gęstości hodowli testowano następujące warunki indukcji:

- Różne szczepy *E. coli*: *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, SHuffle® T7 Express lysY lub Single Step (KRX).
- Różne temperatury i czas indukcji: 37°C lub 30°C przez 4 h oraz 25°C i 15°C przez noc.
- Różne stężenia induktora IPTG: 1 mM oraz 0.1 mM.
- Różne stężenie ramnozy w przypadku szczepu Single Step (KRX): 0,1% lub 0,01%.

Z każdego warunku hodowli pobrano po 1 ml próbki. Próbkę zwirowano przez 5 min 10 tys g w RT. Pelety zachowano do analizy. Efektywność ekspresji konstruktów analizowano za żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących i denaturujących.

Próbki bakteryjne przygotowano w następujący sposób:

Pelet z 1 ml hodowli zawieszono w 150 μ l odczynnika BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck, nr kat. 70584). Inkubowano w RT (23°C) z wytrząsaniem przez 20 min. Następnie próbki wirowano przez 10 min, 10 tys z g w 4°C w celu rozdzielania na frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną. 100 μ l supernatantu przeniesiono do nowej próbki i dodano 12 μ l 6x stężonego buforu próbkowego. Pelet zawieszono w 150 μ l 1 x stężonym buforze próbkowym. Obie frakcje inkubowano przez 7 min w temperaturze 95°C w celu zdenaturowania próbek. Następnie próbki nałożono na żel poliakrylamidowy o stężeniu 4%/15%. Rozwijanie żelu prowadzono przy napięciu 130 V przez 20 min a następnie 180 V do momentu pełnego rozwinięcia się żelu.

Produkcja VHH w dużej skali

Optymalizacja produkcji cząsteczek VHH pozwoliła na wybór najlepszych warunków produkcji. Wybrane najlepsze warianty, były następnie produkowane w kolbach jak i w fermentorze.

200 ml pożywki Terific Broth suplementowane kanamycyną o końcowym stężeniu 50 μ g/ml zostało zaszczerpione pojedynczą hodowlą i hodowano przez noc w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 obr./min. Rano, 2 l pożywki TB suplementowanej kanamycyną zostało zaszczerpione nocną hodowlą bakteryjną w stosunku 1:100 i hodowano do uzyskania gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6-0,8$ w temperaturze 37°C lub 30°C, z wytrząsaniem 200 obr./min. Następnie hodowlę indukowano 1 mM IPTG, przez noc w 25°C. Każde z białek produkowano także w fermentorze 10 l W tym wypadku hodowlę indukowano 0,5 mM IPTG w 25°C. W każdym wypadku właściwe białko otrzymano we frakcji rozpuszczalnej.

Oczyszczanie VHH z E. Coli

Osad bakteryjny zawierający nadprodukowane białka VHH z metką polihistydynową zawieszano w buforze: TrisHCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5% glicerol. Komórki poddawano lizie mechanicznej za pomocą nadciśnienia 20 000 psi. Następnie lizat komórkowy wirowano w 4°C, 60 min 14000 obr./min. Białka rekombinowane oczyszczano za pomocą chromatografii powinowactwa nano-sząc nadsącz (frakcję rozpuszczalną) po wirowaniu, na kolumnę zawierającą złożę Ni-NTA His Bind, a następnie eluując związane białka tym samym buforem zawierającym wzrastające gradientowo stężenie imidazolu (10 – 500 mM). W celu specyficznego odcięcia znacznika polihistydynowego, oczyszczone frakcje białka były traktowane trombiną (1-3 U/mg) i inkubowane w temperaturze 18–25°C. Następnie odcięty znacznik usuwano za pomocą sączenia molekularnego na kolumnie HiPrep Desalting. Był to jednocześnie krok wymiany buforu na formulację do immunokoniugacji (200 mM NaCl, 100 mM fosforan sodu, pH 6,5). Preparaty zagęszczano następnie na Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit z membraną 3 kDa (Merck) do stężenia wymaganego w koniugacji z cytostatykiem.

Synteza genów i uzyskanie rekombinowanego przeciwciała wiążącego się do FOLR1 według aspektu siódmego wynalazku

Przetestowane pod względem specyficzności wiązania do receptorów i bezpieczeństwa stosowania cząsteczki VHH zostały wykorzystane do otrzymania przeciwciała wiążącego się do receptora FOLR1. Geny i gotowe konstrukty otrzymano w analogiczny sposób jak w przypadku fragmentów VHH, stosując SEQ ID NO:21 pierwszego łańcucha VHH-IgG oraz SEQ ID NO:22 drugiego łańcucha VHH-IgG. Zsyntetyzowane geny wklonowano z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych HindIII i XhoI do wektora ekspresyjnego pCDNA3.1+. Dołączenie sekwencji sygnałnej z ludzkiej interleukiny 2 pozwoliło na export białka do pożywki, zwiększając tym samym ekspresję i łatwe oczyszczanie.

We fragmentach Fc wprowadzono dwa zestawy mutacji (wg Merchant i wsp.) S354C, T366W w obrębie jednego łańcucha i Y349C, T366S, L368A, Y407V w obrębie drugiego łańcucha. Mają one na celu ułatwienie formowania w czasie ekspresji i zwijania form heterodimerów.

Co-transfekcje uzyskanych plazmidów do komórek HEK293 uzyskano z wykorzystaniem odczynnika Expifektamina mieszając w sugerowanych przez producenta proporcjach rozcieńczony odczynnik do mieszaniny dwóch plazmidów.

Oczyszczanie przeciwciał Fc

Medium pohodowlane zawierające wydzielone przeciwciała nastrzyknięto na kolumnę zawierającą złożę z białkiem A specyficznie wiążącym fragmenty Fc przeciwciał (MabSelect Sure). Rozdział chromatograficzny wykonano przy przepływie 1 ml/min w buforze PBS pH 7,4. Związane na białku A przeciwciała eluowano buforem z 100 mM cytrynianem sodowym pH 3,3. Niskie pH jednocześnie służyło do neutralizacji ewentualnych wirusów. Następnie preparat szybko neutralizowano dodając 10%

buforu 1,5 M TrisHCl pH 9,0. Finalnie przeciwciała formułowano do buforu PBS pH 7,4 z 5% glicerolem przez sączenie molekularne na kolumnie jak wyżej.

Przykład 5: Określanie powinowactwa VHH i przeciwciał

Wiązanie uzyskanych przeciwciał oraz łańcuchów VHH do receptora FOLR1 za pomocą SPR – analiza specyficzności oddziaływań

Specyficzne oddziaływania uzyskanych cząsteczek VHH, zawierających je przeciwciała i immunokoniugatów były oznaczane z pomocą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (*ang. Surface Plasmon Resonance – SPR*). Metoda polega na immobilizacji jednego z interaktorów na powierzchni sensora, następnie w przestrzeni (komorze) nad sensorem przepuszczane są różne stężenia roztworów drugiego interaktora. Optyczny system detekcji jest w stanie na bieżąco z dużą czułością rejestrować przyrost masy na sensorze, dzięki czemu można śledzić kinetykę asocjacji i dysocjacji oddziaływujących cząsteczek w czasie rzeczywistym.

W tym przypadku na sensorach immobilizowany był docelowy receptor FOLR1. Do przyłączania zachodziło na powierzchni jednej lub dwóch komór sensora przez wiązanie kowalencyjne grup aminowych do grup karboksylowych (*ang. amine coupling reaction*). Koniugację do powierzchni sensora prowadzono do uzyskania pożądanego poziomu obsadzenia, które jest wyliczane na podstawie stosunku mas molowych i stechiometrii obu interaktorów. Dwie z czterech komór sensora nie były obsadzone receptorem i stanowiły powierzchnię referencyjną służącą do odcięcia niespecyficznych sygnałów. Sensory z immobilizowanymi receptorami służyły uniwersalnie do oznaczenia wszystkich klonów VHH i przeciwciał dla danego celu oraz jako referencje negatywne dla klonów VHH i przeciwciał skierowanych przeciw innym celom molekularnym. Pomiar oddziaływań były prowadzone dwuetapowo. W pierwszym etapie na cele molekularne nastrzykiwane były dwa stężenia (10 i 100 nM) każdego VHH lub przeciwciała. Miało to na celu wykazanie zależności sygnału uzyskanego na urządzeniu (poziom RU) od stężenia badanej cząsteczki. Jeżeli uzyskane sygnały były proporcjonalne do różnic w stężeniach, to na podstawie ich poziomu wyznaczano zakres stężeń użytych w drugim etapie do oznaczenia parametrów kinetycznych oddziaływań. Typowy zakres stężeń użytych w badaniu kinetycznym obejmował pięć próbek każdego VHH lub przeciwciała nastrzykniętych na immobilizowany receptor w zakresie stężeń 1 – 100 nM. Wyjątkiem były niektóre klony, które z powodu silnego wiązania, do dokładnego policzenia parametrów wymagały przebadania zakresu stężeń 0,25 – 25 nM. W czasie nastrzyku oraz analizy przepływ w komorze wynosił 30 μ l/min. Pojedynczy nastrzyk trwał 60 s natomiast późniejsza dysocjacja 600 s. Aby skrócić czas badania zastosowano metodę pojedynczego cyklu (*ang. single cycle*). Uzyskane sensogramy obrazujące w czasie rzeczywistym asocjację i dysocjację VHH i przeciwciał do celów molekularnych, posłużyły do obliczenia parametrów kinetyki oddziaływania za pomocą modelu wiązania 1:1. Były to między innymi stała kinetyki asocjacji (ozn. k_a lub k_{on}) – definiująca specyficzność i siłę wiązania i stała kinetyki dysocjacji (ozn. k_d lub k_{off}) definiująca trwałość powstającego kompleksu. Na ich podstawie obliczono stałą dysocjacji KD , która wyrażona w molach, jest wyznacznikiem siły wiązania kompilującym pozostałe stałe (k_d/k_a). Uzyskane wartości posłużyły do stworzenia rankingu najlepszych cząsteczek. Ponadto brak reakcji z innymi receptorami był wyznacznikiem specyficzności.

Tabela 3. Parametry kinetyczne interakcji klonów VHH i przeciwciała według aspektu siódmego wynalazku z ich celem molekularnym

	VHH/przeciwciała k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)
VHH 1G2 jak przedstawiono w SEQ ID NO:12	$9,25 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{-4}$	0,22
VHH 1D9 jak przedstawiono w SEQ ID NO:13	$1,49 \times 10^6$	$1,13 \times 10^{-2}$	7,57
Przeciwciała według aspektu siódmego wynalazku (Przykład 4)	$2,48 \times 10^6$	$2,31 \times 10^{-3}$	0,93

Przykład 6: Immunokoniugacja przeciwciała i formułacja immunokoniugatu

Dla przeciwciała według aspektu siódmego wynalazku (Przykład 4) zoptymalizowano i przeprowadzono proces immunokoniugacji z cząsteczką Monometyloaurystatyny E (MMAE). Wybrana metoda immunokoniugacji opiera się na reakcji aldehydu uzyskanego w wyniku utlenienia N-końcowej treoniny z grupą hydrazydową należącą do łańcucha linkera. Etapy reakcji to kolejno: utlenienie N-końcowej treoniny (bufor: 200 mM NaCl, 100 mM fosforan sodu pH 6,5, 10 15-krotny molowy nadmiar NaIO_4 ,

10 minut, RT, ciemność), przeformułowanie białka (bufor octanowy: 200 mM NaCl, 100 mM octanu sodu, pH 5,0), reakcja z substratem 8310-MMAE (testowano także inne substraty) w obecności aniliny, jako katalizatora (30-krotny molowy nadmiar aniliny, 5-krotny molowy nadmiar substratu, 40–42 h, RT, ciemność). Metoda ta została zoptymalizowana pod względem ilości związku i katalizatora oraz czasu reakcji. Preparaty poszczególnych białek uzyskano z wydajnościami 68–83% w ilościach wystarczających na przeprowadzenie eksperymentów *in vitro* i *in vivo*. Jako ostateczną formulację zastosowano obojętny do podania dla zwierząt PBS pH 7,4. W celu potwierdzenia masy otrzymanych molekuł zastosowano spektrometrię mas (LC-ESI-MS).

W celu uzyskania cząsteczki biologicznej mogącej nieść większy ładunek związku cytostatycznego zastosowano metodę immunokoniugacji opierającą się na reakcji zredukowanych cystein z maleimidami zawartymi w linkerze. Białko poddano redukcji (inkubacja z 10-krotnym molowym nadmiarem TCEP, 18 h, RT), a następnie reakcji ze związkiem MC Val Cit PAB MMAE (10-krotny molowy nadmiar, inkubacja 5 h, RT). W wyniku przeprowadzonej modyfikacji do każdej cząsteczki badanego przeciwciała według wynalazku przyłączono średnio po 6 cząsteczek MMAE. W celu podniesienia stabilności immunokoniugatu przetestowano kilka formułacji, z których jako ostateczną wybrano bufor octanowy (20 mM octan sodu, pH 5,2, 5% (w/v) sacharoza, 0,01% polisorbát 20), dla którego obserwowano niezmienną stabilność w warunkach starzenia przyspieszonego. W celu potwierdzenia masy otrzymanej molekuly zastosowano spektrometrię mas (LC-ESI-MS). Różnicę masy wynikającą z przyłączenia się związku cytostatycznego zaobserwowano także dzięki elektroforezie SDS-PAGE.

Przykład 7: Analiza *in vitro* immunokoniugatu i heterodimerycznego przeciwciała

Analiza aktywności cytotoksycznej immunokoniugatu

W celu określenia aktywności cytotoksycznej immunokoniugatu uzyskanego wg Przykładu 6 i przeciwciała wg Przykładu 4 *in vitro* wobec komórek wybranych linii nowotworowych przeprowadzono test oceny żywotności MTT. Linie komórkowe pochodzące z ludzkich nowotworów zostały pozyskane z ATCC i hodowane w pożywkach zalecanych przez dostawcę. Hodowla prowadzona była w standardowych warunkach: 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności. Komórki odklejano od butelki hodowlanej za pomocą trypsyny, dodano kompletnej pożywki i policzono. Następnie zawiesinę komórek wysiewano w objętości 150 µl na płytce 96-dółkowej w ilościach określonych podanych w Tabeli 4 poniżej.

Tabela 4

Nazwa	Rodzaj nowotworu	Pożywka	Liczba na dołek
NIH:OVCAR-3 ATCC# HTB-161	<i>ludzki nowotwór jajnika</i>	RPMI 1640+ 20% FBS + pirogronian sodu [1mM] + insulina [0,01 mg/ml] + penicylina + streptomycyna	6000
SK-OV-3 ATCC# HTB-77	<i>ludzki nowotwór jajnika</i>	McCoy's 5A + 10% FBS + penicylina + streptomycyna	2000
SW620 ATCC# CCL-227	<i>ludzki nowotwór jelita grubego</i>	DMEM + 10% FBS, penicylina + streptomycyna	6000
A549 ATCC# HTB-185	<i>ludzki nowotwór płuca</i>	RPMI 1640 + 10% FBS +2mM pirogronian sodu + 1% roztwór antybiotyków penicyliny i streptomycyny	A549 ATCC# HTB-185

Płytki inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności. Następnego dnia dodawano testowany immunokoniugat wg Przykładu 6. W tym celu przygotowano serię 10 rozcieńczeń dla każdego preparatu: immunokoniugat, przeciwciało według Przykładu 4 (heterodimer łańcuchów SEQ ID NO: 16 i SEQ ID NO: 17), mieszanina wspomnianego przeciwciała + związek z linkerem oraz związek z linkerem. Jako kontrolę zastosowano dostępny komercyjnie immunokoniugat Trastuzumab - emtanzyna (KADCYLA). Rozcieńczenia preparatów przygotowano w mieszaninie kompletnych pożywek: RPMI-1640, McCoy's 5A i DMEM w stosunku 1:1:1. Następnie dodawano po 50 µl każdego z rozcieńczeń preparatu na płytkę w tryplikatach. Kontrolę – 100% żywotności, stanowiły komórki w kompletnej pożywce. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 72 godzin w 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności.

Po tym czasie przeprowadzono ocenę żywotności komórek *in vitro*. W tym celu wykonano kolorymetryczny test MTT, który stosowany jest do pomiaru proliferacji, żywotności komórek i cytotoksyczności wszelkiego rodzaju związków drobnocząsteczkowych i cząsteczek biologicznych. Test MTT oparty jest na rozkładzie żółtej soli tetrazolowej MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazo-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolu) do nierozpuszczalnego w wodzie purpurowego barwnika formazanu przez obecną w mitochondriach reduktazę bursztyniło-tetrazolową. Redukcja MTT zachodzi jedynie w żywych komórkach. Uzyskane wyniki prezentowane są w postaci wartości IC_{50} (*ang. the half maximal inhibitory concentration*), czyli takiego stężenia testowanego preparatu, które powoduje obniżenie żywotności komórek o połowę w stosunku do żywotności komórek kontrolnych (stanowiących 100% żywotności). Protokół testu MTT wyglądał następująco:

1. Dodano 20 μ l roztworu MTT [5 mg/ml] do każdego dołka.
2. Płytki inkubowano 3 godziny 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności.
3. Usunięto pożywkę z MTT i dodano 100 μ l DMSO w celu rozpuszczenia kryształów formazanu. Jako odniesienie zastosowano dołek bez komórek z DMSO.
4. Wytrząsano płytki do czasu całkowitego rozpuszczenia formazanu.
5. Zmierzono absorbancję przy długości fali 570 nm (referencja 690 nm).
6. Wyniki opracowano za pomocą programu GraphPad Prism 8 w celu wyznaczenia wartości IC_{50} .

Test oceny żywotności MTT wykorzystano również w celu określenia rozpadu immunokoniugatów według Przykładu 6 *in vitro*. Pierwszym etapem było przygotowanie płytek 96-dołkowe z komórkami (wszystkie warunki identyczne jak powyżej). Następnie komórki traktowano immunokoniugatem według Przykładu 6, przeciwciałem według Przykładu 4 i związkiem z linkerem. Zastosowano 7 punktów stężeniowych każdego z preparatów. W odpowiednich punktach czasowych pożywkę z komórek delikatnie odsączano, przepłukiwano komórki kompletną pożywką, następnie dodawano świeżej pożywki i prowadzono dalszą inkubację do 72 godzin w 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności.

Ostatnim etapem było wykonanie testu MTT i określenie IC_{50} za pomocą programu GraphPad Prism 8.

Nazwa	IC_{50} ng/ml, wartości uśrednione			
	Immunokoniugat wg Przykładu 6	Przeciwciało wg Przykładu 4	MMAE+linker	kontrola
NIH:OVCAR-3 ATCC# HTB-161	0,15	3,24	2,56	0,24
SK-OV-3 ATCC# HTB-77	0,35	2,78	3,16	1,13
SW620 ATCC# CCL-227	0,83	3,15	2,18	1,16
A549 ATCC# HTB-185	>2000	>2000	5,16	>2000

Analiza przyłączania się dimerycznego przeciwciała przedstawionego uzyskanego wg Przykładu 4 na powierzchni ludzkich komórek nowotworowych OVCAR-3 wykonana metodą cytometrii przepływową.

Analizowano, czy otrzymane przeciwciało, skierowane przeciwko receptorowi kwasu foliowego (FOLR1) i wyznakowane fluorochromem AF647 przyłącza się do komórek nowotworowych OVCAR-3. Analizę wykonano techniką cytometrii przepływową. W doświadczeniu wykorzystano 4 ludzkie linie komórek nowotworowych. Jako kontrolę pozytywną zastosowano linię OVCAR-3 i linię SW620, które wykazują wysoką ekspresję białka FOLR1. Kontrolę negatywną stanowiły 2 linie: A549 i A431, czyli komórki, które nie mają ekspresji białka FOLR1.

Tabela 5

Nazwa	Rodzaj nowotworu	Pożywka
NIH:OVCAR-3 ATCC# HTB-161	ludzki nowotwór jajnika	RPMI 1640+ 20% FBS + 1mM pirogronian sodu + insulina [0,01 mg/ml]+ 1% roztwór antybiotyków penicyliny i streptomycyny
SW620 ATCC# CCL-227	ludzki nowotwór jelita grubego	DMEM + 10% FBS + 1% roztwór antybiotyków penicyliny i streptomycyny
A549 ATCC# HTB-185	ludzki nowotwór płuca	OBR./MIN.I 1640 + 10% FBS + 2mM pirogronian sodu + 1% roztwór antybiotyków penicyliny i streptomycyny
A431 ATCC# HTB-148	ludzki nowotwór skóry	DMEM + 10% FBS + 1% roztwór antybiotyków penicyliny i streptomycyny

Hodowlę komórek prowadzono na szalkach o średnicy 15 cm. Komórki odklejono przy użyciu 0,5 mM roztworu EDTA. Do analizy pobrano $1,5 \cdot 10^6$ komórek. Zawiesinę komórek wirowano (5 min., 350 g, RT) oraz płukano w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającej 3% płodową surowicą bydlęcą (3% FBS). W celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania się przeciwciał komórki inkubowano (10 min, 25°C) w roztworze PBS z 3% FBS zawierającym FC BLOCK ($2,5 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ komórek/100 μL ; BD Pharmingen # 564220). Komórki rozdzielono do osobnych probówek ($2,5 \cdot 10^5$ komórek/l próbkę) i znakowano przez 30 minut (25°C):

- komercyjnie dostępnym przeciwciałem skierowanym przeciwko białku FOLR1 i wyznakowanym fluorochromem AF647 (1 μL / $2,5 \cdot 10^5$ komórek; Novus Biologicals FAB5646R-100 μg);
- 6 mM fluorochromem AF647 (1:10; 5 μL w 50 μL / $2,5 \cdot 10^5$ komórek);
- 43,6 μM przeciwciała wg Przykładu 4 wyznakowanego fluorochromem AF647 (1:10; 10 μL w 100 μL / $2,5 \cdot 10^5$ komórek);
- 43,6 μM immunokoniugatu wg Przykładu 6 wyznakowanego fluorochromem AF647 (1:20; 5 μL w 100 μL / $2,5 \cdot 10^5$ komórek).

Kontrolę stanowiły komórki nie wyznakowane. Wszystkie próbki płukano w 1 ml PBS z 3% FBS trzykrotnie. Komórki zawieszano w 0,5 ml PBS z 3% FBS i analizowano w cytometrze przepływowym FACS Canto. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach biologicznych. Uzyskane dane analizowano przy użyciu oprogramowania FlowJo.

Analiza wykazała, że przeciwciała wg Przykładu 4 oraz immunokoniugat wg Przykładu 6 skierowane przeciwko FOLR1 przyłączają się do komórek, które wykazują wysoką ekspresję FOLR1 (linie OVCAR-3 i SW620).

Bezpieczeństwo przeciwciała immunokoniugatu in vivo na modelu mysim

Wyznaczenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) na modelu mysim.

Zweryfikowanie bezpieczeństwa przeciwciała wg Przykładu 4 i immunokoniugatu wg Przykładu 6 in vivo na modelu mysim zostało przeprowadzone na szczepie Hsd:Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*, cechującym się brakiem tworzenia cytotoksycznych komórek efektorowych oraz niedoborem limfocytów T. Żeby określić bezpieczeństwo zastosowanych immunokoniugatów wykonano badanie MTD (z ang. *Maximal Tolerated Dose*), które polega na wytypowaniu maksymalnej dawki, która zapewnia najefektywniejsze działanie badanej cząsteczki nie wywołując przy tym dotkliwych skutków ubocznych, między innymi ponad 20% spadek masy ciała określany wobec wyjściowej masy ciała myszy (wszystkie skutki uboczne określane mianem łagodne, umiarkowane i dotkliwe zostały scharakteryzowane przez Federację Europejskich Stowarzyszeń Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych – FelLASA).

Badanie MTD zostało przeprowadzone wedle znanego w dziedzinie schematu z redukcją lub eskalacją dawki w zależności od obserwowanych działań ubocznych.

Badanie MTD

Badanie MTD przeprowadzono dla dawki 20 mg/kg b. w immunokoniugatu wg Przykładu 6 i 20 mg/kg przeciwciała wg Przykładu 4 wraz z kontrolami: pozytywną 8310-MMAE (lek cytostatyczny monometyloaurystatyna E skoniugowany z linkerem) oraz negatywną PBS + 2% DMSO (dodatek 2% DMSO umożliwił wykluczenie wpływu samego DMSO na wyniki badań) w schemacie podania qldx7 (raz dziennie, 7 dni pod rząd) dożylnie (do żyły ogonowej). Ponieważ w pierwszej fazie (n=1) w przypadku

żadnego z badanych przeciwciała i immunokoniugatu nie zaobserwowano dotkliwych skutków ubocznych, przeprowadzono badanie na kolejnych dwóch myszach, tak żeby w sumie $n=3$. Spadek masy ciała nieprzekraczający 20% początkowej masy ciała, brak innych widocznych skutków ubocznych takich jak m.in. brak aktywności indukowanej jak i spontanicznej oraz wyniki biochemii i morfologii krwi pozwoliły na określenie maksymalnej tolerowanej dawki na poziomie ok. 20 mg/kg b.w dla immunokoniugatu wg Przykładu 6 i przeciwciała wg Przykładu 4.

Dla immunokoniugatu wg Przykładu 6 oraz przeciwciała wg Przykładu 4 testowano dawkę 5 mg/kg b.w. W obu przypadkach badane myszy wykazywały znikome skutki uboczne po podaniu testowanych związków.

Przykład 8: Wyznaczenie efektywności przeciwnowotworowej badanych związków na ludzkich ksenotransplantantach w modelu mysim

Badanie to polegało na zaszczepieniu komórek ludzkiego gruczolakoraka jajnika (OVCAR-3) zawieszonych w medium wspomagającym rozwój guza w prawy bok myszy Hsd:Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*, pomiar wzrostu guza, a następnie podanie badanych immunokoniugatu według Przykładu 6 i przeciwciała wg Przykładu 4 pomiar zmniejszania się guza.

Czas trwania eksperymentu jest uzależniony od tempa wzrostu guzów, ponieważ dopiero przy osiągnięciu średnio objętości guza $V=200\text{ mm}^3$ następuje randomizacja myszy i utworzenie grup eksperymentalnych tak, żeby w każdej grupie były podobne objętości guzów.

Testowano immunokoniugat według Przykładu 6 oraz przeciwciało wg Przykładu 4 wraz z odpowiednimi kontrolami takimi jak:

- a) bufor PBS – jako kontrola negatywna,
- b) 8310-MMAE – jako kontrola pozytywna.

Utworzono 10 grup eksperymentalnych, w których $n=5$. Związki podawane były w schemacie q2dx7 (co drugi dzień, 7 razy), testowano dawkę 15 mg/kg b.w. Związki były podawane dożylnie (do żyły ogonowej).

Wielkość guza mierzono przy pomocy suwmiarki elektronicznej, objętość guza liczono według wzoru: $(a^2 \times b)/2$, gdzie a = krótsza przekątna guza (mm) oraz b = dłuższa przekątna guza (mm). Zahamowanie wzrostu guza obliczano przy pomocy wzoru:

$TGI\ (\%) = (WT/WC) \times 100 - 100\%$,

gdzie WT odnosi się do średniej objętości guza w grupie traktowanej, WC odpowiada średniej objętości guza w grupie kontrolnej.

Wyniki eksperymentów przedstawiono jako wielkość średnią ($\bar{x}$) $\pm$ SD (SD). Wszystkie obliczenia oraz wykresy przygotowane zostały przy pomocy programu GraphPad Prism 5.0.

Dla immunokoniguatu w 50 dniu po implantacji guza zaobserwowano zmniejszanie objętości guza przy wartości TGI średnio 95% $\pm$ 5%, a dla przeciwciała zaobserwowano zmniejszanie objętości guza wartości TGI średnio 80% $\pm$ 5%. Kontrola pozytywna skutkowała >98% TGI. Nie obserwowano żadnego zmniejszenia objętości guza dla kontroli negatywnej.

Lista sekwencji

SEQUENCE LISTING

<110> Adamed Pharma S.A.

<120> Przeciwciało anty-FOLR1 i jego zastosowanie w medycynie

<130> BIOCON_INNOMED II

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 1

Ile Thr Phe Ser Thr Thr Val
1 5

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 2

Ile Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Asn Tyr Val
1 5 10

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 3

Gly Asp Tyr Val Tyr
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 4

Ser Val Val Ser Asp Ala Val
1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 5

Val Ile Asn Thr Val Gly Ser Thr Ala Tyr Ala
 1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 6

His Arg Ser Gly Tyr Ile Tyr
 1 5

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 8

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 9

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 1 5 10 15

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
 20 25 30

Tyr Tyr Cys Asn Ala Asn
 35

<210> 10
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 10

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Ser
 1 5 10 15

Thr Ile Phe Leu Glu Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
 20 25 30

Tyr Tyr Cys Asn Ala Asn
 35

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 11

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 12
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Thr Thr
 20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ile Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Asn Gly Asp Tyr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Val Ser Asp Ala
 20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Val Ile Asn Thr Val Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ile Phe Leu
 65 70 75 80

Glu Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Asn His Arg Ser Gly Tyr Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc ludzkich IgG z mutacjami do heterodimeryzacji

<400> 14

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 15

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc ludzkich IgG z mutacjami do heterodimeryzacji

<400> 15

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 16
<211> 356
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pierwszy łańcuch heterodimeru (VHH1+Fc IgG) <400>
16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Thr Thr
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ile Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Asn Gly Asp Tyr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser
115 120 125

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
130 135 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145 150 155 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
165 170 175

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
180 185 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 195 200 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 245 250 255

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 260 265 270

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350

Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 17
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> drugi łńcuch heterodimeru (VHH1+Fc IgG) <400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Val Ser Asp Ala

20 25 30
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Asn Thr Val Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ile Phe Leu
 65 70 75 80
 Glu Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Ala Asn His Arg Ser Gly Tyr Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro
 115 120 125
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 130 135 140
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 145 150 155 160
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 165 170 175
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 180 185 190
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 195 200 205
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 210 215 220
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 325 330 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 18
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> łańcuch dojrzały FOLR1 w fuzji z fragmentem Fc i sekwencji
 sygnałowej IgG

<400> 18

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys
 20 25 30

Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu
 35 40 45

His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn
 50 55 60

Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn
 65 70 75 80

Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile
 85 90 95

Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile
 100 105 110

Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro
 115 120 125

Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser
 130 135 140

Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr
 165 170 175

Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr
 180 185 190

Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp
 195 200 205

Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr
 210 215 220

Ala Ala Ala Met Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Ser Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Glu Pro Lys Ser Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

340 345 350
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly His
 465 470 475 480
 His His His His His
 485

<210> 19
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pierwszy łańcuch Fc IgG

<400> 19
 gaaccgaaaa gctgcgataa aaccataacc tgcccgcctg gcccgccgcc ggaactgctg 60
 ggcggcccca gcggttttct gttccgccg aaaccgaaag ataccctgat gattagccgc 120
 accccggaag tgacctgcgt ggtggtgat gtgagccatg aagatccgga agtgaaattt 180
 aactggtatg tggatggcgt ggaagtgc atacgcgaaaa ccaaaccgcg cgaagaacag 240
 tataacagca cctatcgctg ggtgagcgtg ctgaccgtgc tgcacagga ttggctgaac 300
 ggcaaagaat ataatgcaa agtgagcaac aaagcgctgc cggcgccgat tgaaaaaacc 360
 attagcaaa gaaaggcca gccgcgcgaa ccgcaggtgt gcaccctgcc gccgagccgc 420

gatgaactga ccaaaaacca ggtgagcctg agctgcgcgg tgaaaggctt ttatccgagc 480
 gatattgcgg tggaatggga aagcaacggc cagccggaaa acaactataa aaccacccccg 540
 ccggtgctgg atagcgatgg cagctttttt ctggtgagca aactgaccgt ggataaaagc 600
 cgctggcagc agggcaacgt gtttagctgc agcgtgatgc atgaagcgct gcataaccat 660
 tatacccaga aaagcctgag cctgagcccc ggcaaa 696

<210> 20
 <211> 695
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> drugi łańcuch Fc IgG

<400> 20
 gaaccgaaaa gctgcgataa aaccataacc tgcccgcctg gcccgcgcc ggaactgctg 60
 ggcggcccg gctgtttct gttccgccc aaaccgaaag ataccctgat gattagccgc 120
 accccggaag tgacctgcgt ggtggtgat gtgagccatg aagatccgga agtgaaattt 180
 aactggtatg tggatggcgt ggaagtgc atacgcgaaa ccaaacccg cgaagaacag 240
 tataacagca cctatcgct ggtgagcgtg ctgaccgtgc tgcacagga ttggctgaac 300
 ggcaaagaat ataaatgcaa agtgagcaac aaagcgctgc cggcgccgat tgaaaaaacc 360
 attagcaaag cgaaaggcca gccgcgcgaa ccgcaggtgt ataccctgcc gccgtgccgc 420
 gatgaactga ccaaaaacca ggtgagcctg tggcgctgg tgaaaggctt ttatccgagc 480
 gatattgcgg tggaatggga aagcaacggc cagccggaaa acaactataa aaccacccccg 540
 ccggtgctgg atagcgatgg cagctttttt ctgtatagca aactgaccgt ggataaaagc 600
 cgctggcagc agggcaacgt gtttagctgc agcgtgatgc atgaagcgct gcataaccat 660
 tatacccaga aaagcctgag cctgagcccc ggcaa 695

<210> 21
 <211> 1068
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> łańcuch pierwszy heterodimeru (VHH1+Fc IgG)

<400> 21
 gaagtgcagc tggtgaaaag cggcgccggc ctggtgcagg cggcgccgag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcggcat taccttagc accaccgtga tgggctggta tcgccaggcg 120
 ccgggcaaac agcgcgaact ggtggcgatt attagccgcg tgggcagcac caactatgtg 180

gatagcgtga aagggcgctt taccattagc cgcgataacg cgaaaaacac cgtgtatctg 240
cagatgaaca gcctgaaacc ggaagatacc gcggtgtatt attgcaacgc gaacggcgat 300
tatgtgtatt ggggccaggg caccaggtg accgtgagca gcggcggcgg cggcagcggc 360
ggcggcgga gcgaaccgaa aagctgcgat aaaaccata cctgcccgcg gtgcccggcg 420
ccggaactgc tggcgggccc gagcgtgtt ctgttccgc cgaaaccgaa agataccctg 480
atgattagcc gcaccccgga agtgacctgc gtggtggtg atgtgagcca tgaagatccg 540
gaagtgaat ttaactgga tgtggatggc gtggaagtgc ataacgcgaa aaccaaaccg 600
cggaagaac agtataacag cacctatgc gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcatcag 660
gattggtga acggcaaaga atataatgc aaagtgagca acaaagcgt gccggcgccg 720
attgaaaaa ccattagcaa agcgaaaggc cagccgcgcg aaccgcaggt gtgcaccctg 780
ccgccgagcc gcgatgaact gacaaaaac caggtgagcc tgagctgcgc ggtgaaaggc 840
tttatccga gcgatattgc ggtggaatgg gaaagcaac gccagccgga aaacaactat 900
aaaaccacc cgccgtgct ggatagcgat gccagcttt ttctggtgag caaactgacc 960
gtggataaaa gccgctggca gcagggcaac gtgttagct gcagcgtgat gcatgaagcg 1020
ctgcataacc attatacca gaaaagcctg agcctgagcc cgggcaaa 1068

<210> 22

<211> 1074

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> drugi łańcuch heterodimeru (VHH1+Fc IgG)

<400> 22

gaagtgcagc tggaggaaag cggcggcggc ctggtgcagg cggcgggcag cctgcgcctg 60
agctgcgcgg cgagcggcag cgtggtgagc gatgcggtga tgggctgga tcgccaggcg 120
ccgggcaaac agcgcgaact ggtggcgggtg attaacaccg tgggcagcac cgcgtatgcg 180
gatagcgtga aagggcgctt taccattagc cgcgatattg cgaaaagcac cattttctg 240
gaaaccaaca gcctgaaacc ggaagatacc gcggtgtatt attgcaacgc gaaccatcgc 300
agcggctata ttattgggg ccagggcacc caggtgaccg tgagcagcgg cggcggcggc 360
agcggcggcg gcggcagcga accgaaaagc tgcgataaaa ccctacctg cccgccgtgc 420
ccggcgccgg aactgctggg cggcccgagc gtgtttctgt ttccgccgaa accgaaagat 480
accctgatga ttagccgcac cccggaagtg acctgcgtgg tggatgatgt gagccatgaa 540
gatccggaag tgaaatttaa ctggtatgt gatggcgtgg aagtgcataa cgcgaaaacc 600
aaaccgcgcg aagaacagta taacagcacc tatcgcgtgg tgagcgtgct gaccgtgctg 660

catcaggatt ggctgaacgg caaagaatat aaatgcaaag tgagcaacaa agcgctgccg 720
 gcgccgattg aaaaaacat tagcaaagcg aaaggccagc cgcggaacc gcaggtgtat 780
 accctgccgc cgtgccgga tgaactgacc aaaaaccagg tgagcctgtg gtgcctggtg 840
 aaaggctttt atccgagcga tattgcggtg gaatgggaaa gcaacggcca gccggaaaac 900
 aactataaaa ccacccgcc ggtgctggat agcgatggca gctttttct gtatagcaaa 960
 ctgaccgtgg ataaaagccg ctggcagcag ggcaacgtgt ttagctgcag cgtgatgcat 1020
 gaagcgctgc ataaccatta taccagaaa agcctgagcc tgagcccggg caaa 1074

<210> 23
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Lama glama

<400> 23
 gaagtgcagc tgggtgaaag cggcgccggc ctggtgcagg cgggcggcag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcggcat taccttagc accaccgtga tgggctgga tcgccaggcg 120
 ccgggcaaac agcggaact ggtggcgatt attagccgcg tgggcagcac caactatgtg 180
 gatagcgtga aaggccgctt taccattagc cgcgataacg cgaaaaacac cgtgtatctg 240
 cagatgaaca gcctgaaacc ggaagatacc gcggtgtatt attgcaacgc gaacggcgat 300
 tatgtgtatt ggggccaggg caccaggtg accgtgagca gc 342

<210> 24
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Lama glama

<400> 24
 gaagtgcagc tgggtgaaag cggcgccggc ctggtgcagg cgggcggcag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcggcag cgtggtgagc gatgcggtga tgggctgga tcgccaggcg 120
 ccgggcaaac agcggaact ggtggcggtg attaacaccg tgggcagcac cgcgtatgcg 180
 gatagcgtga aaggccgctt taccattagc cgcgatattg cgaaaagcac catttttctg 240
 gaaaccaaca gcctgaaacc ggaagatacc gcggtgtatt attgcaacgc gaaccatcgc 300
 agcggtata ttattgggg ccagggcacc caggtgaccg tgagcagc 348

Zastrzeżenia patentowe

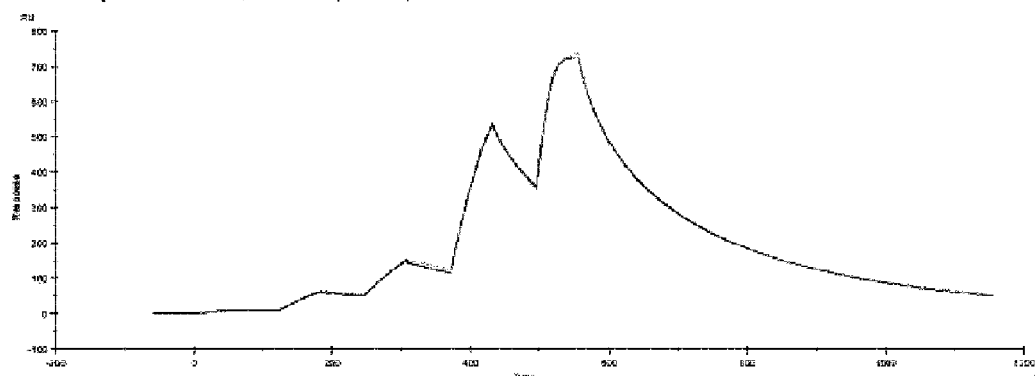
1. Przeciwciało anty-FOLR1 zawierające pierwszy i drugi fragment przeciwciała, przy czym
 - pierwszy fragment przeciwciała anty-FOLR1 zawiera pierwszy łańcuch VHH funkcjonalnie połączony z pierwszym fragmentem stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG, i
 - drugi fragment przeciwciała anty-FOLR1 zawiera drugi łańcuch VHH funkcjonalnie połączony z drugim fragmentem stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG, i przy czym
 - wspomniany pierwszy łańcuch VHH zawiera region determinujący komplementarność (CDR) składający się z CDR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 1, CDR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 2 i CDR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 3 oraz region zrębowy (FR) składający się z FR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 7, FR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 8, FR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 9 i FR4 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 11, a
 - wspomniany drugi łańcuch VHH zawiera region determinujący komplementarność (CDR) składający się z CDR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 4, CDR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 5 i CDR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 6 oraz region zrębowy (FR) składający się z FR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 7, FR2 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 8, FR3 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 10 i FR4 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 11.
2. Przeciwciało według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że pierwszy łańcuch VHH ma sekwencję jak przedstawiono w SEQ ID NO: 12, a drugi łańcuch VHH ma sekwencję jak przedstawiono w SEQ ID NO: 13.
3. Przeciwciało anty-FOLR1, według zastrz. 1 albo 2, **znamiennie tym**, że pierwszy fragment stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG ma sekwencję jak przedstawiono w sekwencji SEQ ID NO: 14, a drugi fragment stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG ma sekwencję jak przedstawiono w sekwencji SEQ ID NO: 15.
4. Przeciwciało anty-FOLR1, według zastrz. 1, 2 albo 3, **znamiennie tym**, że pierwszy fragment przeciwciała anty-FOLR1 ma sekwencję jak przedstawiono w SEQ ID No: 16, drugi fragment przeciwciała anty-FOLR1 ma sekwencję jak przedstawiono w SEQ ID No: 17.
5. Wyizolowany polinukleotyd kodujący białko wybrane z grupy składającej się z:
 - pierwszego fragmentu przeciwciała anty-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 21;
 - drugiego fragmentu przeciwciała anty-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 22;
 - pierwszego fragmentu stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 19;
 - drugiego fragmentu stałego łańcucha ciężkiego Fc ludzkiej IgG jak przedstawiono w sekwencji aminokwasowej SEQ ID NO: 20;
 - pierwszego łańcucha VHH anty-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 23;
 - drugiego łańcucha VHH anty-FOLR1 jak przedstawiono w SEQ ID NO: 24.
6. Wyizolowany polinukleotyd według zastrz. 5, **znamiennie tym**, że wspomniany polinukleotyd ma sekwencję nukleotydową SEQ ID NO: 21 i/lub SEQ ID NO: 22.
7. Wektor ekspresyjny, **znamiennie tym**, że zawiera polinukleotyd jak określono w zastrz. 5 albo 6.
8. Komórka gospodarza, **znamiennie tym**, że wspomniana komórka gospodarza zawiera wektor ekspresyjny jak określono w zastrz. 7, albo polinukleotyd jak określono w zastrz. 5 albo 6 zintegrowany z genomem komórki gospodarza.
9. Sposób wytwarzania przeciwciała anty-FOLR1 obejmujący etapy:
 - (a) hodowanie komórki gospodarza jak określono w zastrz. 8 w warunkach odpowiednich do wytwarzania przeciwciała, a tym samym uzyskanie hodowli zawierającej wspomniane przeciwciało anty-FOLR1; oraz
 - (b) izolowanie lub odzyskiwanie wspomnianego przeciwciała anty-FOLR1 ze wspomnianej hodowli.
10. Immunokoniugat, **znamiennie tym**, że wspomniany immunokoniugat zawiera:
 - (a) przeciwciało anty-FOLR1 jak określono w którymkolwiek z zastrz. 1 do 4; oraz
 - (b) część sprzężoną wybraną z grupy składającej się z wykrywalnego markera, leku, toksyny, cytokiny, radionuklidu i enzymu.
11. Przeciwciało jak określono w zastrz. 1 do 4 albo immunokoniugat jak określono w zastrz. 10 do stosowania jako (a) środek do wykrywania cząsteczki FOLR1; albo (b) lek do leczenia raka.

12. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca:
 - (i) przeciwciało anti-FOLR1 jak określono w zastrz. 4, albo immunokoniugat jak określono w zastrz. 10; oraz
 - (ii) farmaceutycznie dopuszczalny nośnik.
13. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 12 do zastosowania w leczeniu raka.
14. Zastosowanie przeciwciała anti-FOLR1 jak określono w zastrz. 4, albo immunokoniugatu jak określono w zastrz. 10 do przygotowania środka, płytki do wykrywania lub zestawu, przy czym wspomniany środek, płytkę lub zestaw do wykrywania stosuje się do wykrywania białka FOLR1 w badanej próbce.

Rysunek

Kinetics: 'AFR-1G2 anti FOLR', fit: '1: 1:1 Binding'

Curve: Fc4-3 Ligand: FOLR1 human Sample: AFR-1G2 anti FOLR Temp: 25°C



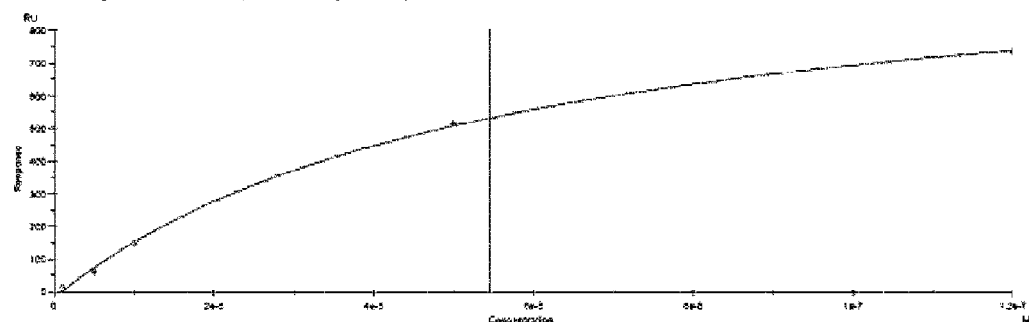
Kinetics: 'AFR-1G2 anti FOLR', fit: '1: 1:1 Binding' (continued)

Report table

Curve	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	R_{max} (RU)	Conc (M)	t_c	Flow (ul/min)	k_t (RU/Ms)	R_t (RU)	χ^2 (RU%)	U-value
1	1.761E+6	0.02293	1.302E-8	804.8	7.503E+7					15.4	1
					1.000E-9		36.00	2.331E+8	0.7270		
					5.000E-9				3.027		
Cycle: 2					1.000E-8				7.664		
					5.000E-8				9.585		
					1.200E-7				-1.957		

Affinity: 'AFR-1G2 anti FOLR', fit: '1: Steady State Affinity'

Curve: Fc4-3 Ligand: FOLR1 human Sample: AFR-1G2 anti FOLR Temp: 25°C



Report table

KD (M)	R_{max} (RU)	offset (RU)	χ^2 (RU%)
5.460E-8	750	0	15.4
1.302E-8	804.8	-19.10	15.4

Fig. 1