P0102005

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A2

# CD23 elleni antitestek, ezek származékai, és gyógyászati alkalmazásuk

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezik a CD23 (FCεRII) II. típusú molekulát kötő, előnyösen humanizált antitestek, amelyek a CD23 (FCεRII) II. típusú molekulát előnyösen Ka = $1*10^9$ $M^{-1}$ értékkel egyenlő vagy annál nagyobb affinitási állandóval kötik, továbbá az ilyen antitestek előállítása, az ilyen antitesteket tartalmazó gyógyászati készítmények, és e készítmények terápiás alkalmazása különösen az autoimmun és gyulladásos elváltozások kezelésében.

ábra: Ø

Aktaszámunk: 93333-5194/SG

P/10 2005

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A2

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

# CD23 elleni antitestek, ezek származékai, és gyógyászati alkalmazásuk

A találmány tárgyát képezik a CD23 (FCεRII) II. típusú molekulát kötő, előnyösen humanizált antitestek, amelyek a CD23 (FCεRII) II. típusú molekulát előnyösen Ka = $1*10^9$ $M^{-1}$ értékkel egyenlő vagy annál nagyobb affinitási állandóval kötik, továbbá az ilyen antitestek előállítása, az ilyen antitesteket tartalmazó gyógyászati készítmények.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható autoimmun és gyulladásos elváltozások kezelésében.

A CD23 (FCεRII) a C-lektin családba tartozó II. típusú molekula, amely a limfocita hazairányító receptort („*Lymphocyte Homing Receptor*", MEL-14) és az 1-es endotél leukocita adhéziós molekulát („*Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule*", ELAM-1) tartalmazza. A CD23 (FCεRII) az IgE-nek egy alacsony affinitású receptora. Az emberben különféle hematopoietikus sejtek - köztük folliculáris dendriticus sejtek, a B-sejtek, a T-sejtek és a makrofágok - expresszálnak CD23-at a felszínükön. A CD23 molekula,

oldható állapotban, a biológiai folyadékokban is előfordul. Az oldható CD23 (sCD23) molekulák a transzmembrán receptorok proteolitikus hasításával képződnek. A CD23-nak pleiotropikus aktivitása van, azaz többek között közvetíti a sejtadhéziót, szabályozza az IgE- és a hisztaminfelszabadítást, megvédi a B-sejteket a sejthalál ellen és szabályozza a myeloid sejtek növekedését. E funkcionális működések a sejtekhez asszociálódott CD23, illetve sCD23 specifikus ligandumainak megkötésével hozhatók kapcsolatba (az sCD23 a citokinekhez hasonló módon hat) [Conrad, Annu. Rev. Immunol. 8, 623-645 (1990); Delespesse és mtsai., Adv. Immunol. 49, 149-191 (1991); Bonnefoy és mtsai., Curr. Opin. Immunol. 5, 944-947 (1993)].

Számos gyulladásos betegség esetében a CD23 megnövekedett expresszióját tapasztalták. A CD23-at azonosították krónikus ízületihártya-gyulladásban szenvedő betegek ízületi nedvéből származó mintáiból, illetve a normális tartományt meghaladó sCD23 szintet lehet mérni a rheumatoid arthritisben szenvedő betegek szérumában és ízületi nedvében is [Bansal, Oliver, Marsh, Pumphrey és Wilson, Immunology 79, 285-289 (1993); Hellen, Rowlands, Hansel, Kitas és Crocker, Clin. Pathol. 44, 293-296 (1991); Chomarat, Brioloay, Banchereau, és Miossec, Arthritis Rheum. 86, 234-242 (1993); Bansal és mtsai., Clin. Exp. Immunol. 89, 452-455 (1992); Rezonzew és Newkirk, Clin. Immunol. Immunpathol. 71, 156-163 (1994)]. Ezenfelül, a rheumatoid arthritisben szenvedő betegek szérumának sCD23-szintje összefüggésben van a betegség állapotával, és kor-

relációban van a szérumban található rheumatoid faktorral [Bansal és mtsai., Clin. Exp. Rheumatol. 12, 281-285 (1994.]. A gyulladás előtti citokinek az rheumatoid arthritis esetében különösen fontosnak tűnnek, illetve lehetségesnek tartják, hogy az izületek leépülésében a TNF-α és az IL-1β központi szerepet tölt be [Brennan, Chantry, Jackson, Maini és Feldman, Lancet 2, 144-147 (1989); Brennan, Maini, és Feldman Br. J. Rheumatol. 31, 293-298 (1992)].

Az antitestek jellemzően két, egymással diszulfidhíddal összekapcsolt nehézláncot, illetve két könnyűláncot tartalmaznak. Mindegyik könnyűlánc a megfelelő nehézlánchoz diszulfidhíddal kapcsolódik. Minden egyes nehézláncnak az egyik végén egy variábilis domén, és az azt követő állandó (*konstans*) domének vannak. A könnyűlánc egyik végén egy variábilis domén, a másik végén pedig állandó domén van. A könnyűlánc variábilis doménje a nehézlánc variábilis doménjéhez illeszkedik. A könnyűlánc állandó doménje a nehézlánc első állandó doménjéhez illeszkedik. A könnyűlánc és a nehézlánc állandó doménjei az antigén antitestkötésében közvetlenül nem vesznek részt.

Az antigénkötő helyet a nehézlánc-könnyűlánc párok variábilis doménjei alkotják. A könnyűláncokon és a nehézláncokon található domének általános felépítése azonos, és minden egyes domén négy régió vázszekvenciát tartalmaz, mely régiók szekvenciája viszonylag állandósult. A régiók egymással három, a komplementaritást meghatározó régióval (*Complementarity Determining Regions*, CDRs, CDR-ek) kapcso-

lódnak össze. A négy régió vázszekvenciája nagyjából β-lemez konformációjú. A CDR-ek ezeket a β-lemezeket összekapcsoló hurkokat, illetve néhány esetben a β-lemezek egy részét alkotják. A régiók vázszekvenciái szoros közelségben tartják a CDR-eket, és más domének CDR-jeivel együtt részt vesznek az antigént kötő hely kialakításában. Az antitestek CDR-jei és régiók vázszekvenciái a Kabat és mtsai. által leírtak szerint meghatározhatók [Kabat és mtsai., „Sequences of proteins of immunological intereset", US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987)].

Az olyan megváltoztatott antitestek előállítása, amelyekben egy rágcsálóeredetű variábilis régiót a humán antitest állandó (*konstans*) régiójával kombinálunk manapság a technika állása szerint jól ismert [Oi és Morrison, BioTechniques 4, 212-214 (1986)]. Az EP-A-0239400 európai közzétételi irat olyan, humanizált antitesteket tár fel, melyekben a CDR-ek más forrásból származnak, mint az antitest variábilis doménjének vázszekvenciája. A CDR-ek származhatnak rágcsáló vagy főemlős monoklonális antitestekből. A variábilis domén vázszekvenciája és az antitest állandó doménjei általában emberi antitestből származnak. Emberi alkalmazás esetén, az ilyen megváltoztatott antitestek feltehetően nem váltak ki olyan erős immunválaszt, mint amilyet egy teljesen idegen antitest, mint például egy rágcsálóból származó antitest, ellen váltana ki.

Egérben már termeltettek CD23-receptor (FCεRII) elleni monoklonális antitestet (PCT/EP/95/04109 nemzetközi közzétételi irat és európai közzétételi irat). Azonban, a monoklonális antitestek humán gyógyászati célokra nem alkalmasak, mivel beinjekciózás esetén immunogének és feltehetően fokozatosan lebomlanak. Továbbá, a kereskedelemben elérhető, CD23-receptort kötő antitestek a CD23-receptoron expresszálódott, különálló epitópokat ismerik fel. Az epitópkötő specificitás egy konkrét célra kifejlesztett antitest hatékonyságában lényeges szerepet tölthet be. Ezenfelül, a kérdéses receptor vonatkozásában, a magas affinitású antitestek kiválasztása gyógyászati szempontból előnyös lehet, amennyiben a szükséges dózis alacsonyabb, mint az azonos receptorra nézve alacsonyabb affinitást mutató monoklonális antitestté.

A találmány egy megvalósítási módja szerint olyan, megváltoztatott antitestet állítunk elő, amely az alábbiakban bemutatásra kerülő minden egyes CDR aminosavszekvenciájából elegendő hosszúságú szakaszt tartalmaz ahhoz, hogy az antitest képes legyen kötődni a hematopoietikus sejteken expresszálódott CD23 (FCεRII) II. típusú molekulához.

**Könnyűlánc**

RSSKSLLY KDGKTYLN CDRL1 (a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia)

LMSTRAS…. CDRL2 (a szekvencialistában 5. azonosítószámon megadott szekvencia)

QQLVEYPFT CDRL3 (a szekvencialistában 7. azonosítószámon megadott szekvencia)

**Nehézlánc**

GYWMS..... CDRH1 (a szekvencialistában 9. azonosítószámon megadott szekvencia)

EIRLKSDNYATHYAESVKG CDRH2 (a szekvencialistában 11. azonosítószámon megadott szekvencia)

FID..... CDRH3 (a szekvencialistában 13. azonosítószámon megadott szekvencia)

A találmány tárgyát képezi továbbá antitest, amely ugyanazokhoz az epitópokhoz kötődik, mint a fent leírt CDR-eket tartalmazó antitest. Egy antigénen, mint amilyen a CD23-molekula, az epitópok feltérképezésére kompetitív gátlási szűrővizsgálatokat alkalmazhatunk. Például a FACS kompetíció-analízis olyan sejtek alkalmazásán alapul, amelyek a molekulát célmolekulaként expresszálják. Az analízisben a tesztelni kívánt antitestet egy fluorokrómmal jelöltük, egy második antitestet pedig, amelyről tudjuk, hogy ugyanahhoz az antigénhez kötődik, egy második, eltérő színű fluorokrómmal. Amennyiben mindkét fluorokróm jelen van, az antitestek nem gátolják kompetitíven egymás kötődését, és ezáltal úgy tekintjük, hogy elkülönült epitópokat ismernek fel a célmolekulán. Az epitóptérképezés elvégezhető közvetlen peptid-könyvtár kötési szűrővizsgálattal („*direct peptide library binding assay*") is, mely során a kiválasztott antigénből származó peptid-szekvenciákat mintahordozó tűkön („pin") expresszáljuk és az előzőekben leírtak szerint, fluorokrómmal jelzett antitestekkel szkríneljük. Az

epitóptérképezési vizsgálatokban, a fent leírt CDR-eket tartalmazó antitestekről kimutattuk, hogy egy újszerű epitópot határoznak meg a CD23 molekulán. Ezért tehát a találmány tárgyát képezi egy antitest, mely kompetitíve gátolja a fent felsorolt CDR-szekvenciákat tartalmazó antitest kötődését a hematopoietikus sejtekben expresszált CD23 (FCεRII) II. típusú molekulához.

A találmány szerinti antitest, előnyösen, egy megváltoztatott antitest. Ez az antitest lehet kiméra antitest, amely az 1-2. ábrán felsorolt, egéreredetű C11-antitest nehézlánca és könnyűlánca variábilis szekvenciáinak (a szekvencialistában 1 és. azonosítószámon megadott szekvenciák, illetve a szekvencialistában 46, 47, 50 és 51. azonosítószámon megadott szekvenciák) elegendő részét tartalmazza ahhoz, hogy képes legyen a CD23 molekulához és egy humán állandó régióhoz kötődni. Az antitest lehet például olyan kiméra antitest típus, mint amelyet a WO 86/01533 nemzetközi közzétételi iratban írtak le. Ez a kiméra antitest egy antigénkötő régiót és egy nem immunglobulin eredetű régiót tartalmaz. Az antigénkötő régió egy antitest könnyűláncának variábilis doménje és/vagy nehézláncának variábilis doménje. A kiméra antitest, jellemzően, mind könnyűlánc- és mind pedig nehézlánc-eredetű variábilis doménokat tartalmaz. A nem immunglobulin-eredetű régió az antigénkötő régió C-terminálisához van fuzionálva. A nem immunglobulin-eredetű régió, jellemzően, egy nem immunglobulin-eredetű protein, amely származhat egy ismert kötési specificitású enzimfehérje egyik régiójából, egy fehérje-toxinból, sőt

lehet bármilyen, gén által expresszált protein. A nem immunglobulin-eredetű régió lehet például szénhidrátrégió is. A kiméra-antitest két régióját egy hasítható linker szekvenciával kapcsolhatjuk össze. A megváltoztatott antitest lehet bi-specifikus antitest is.

A megváltoztatott antitest lehet például egy olyan humanizált antitest, amelyben minden egyes CDR-ből származó, egy vagy több aminosav-szekvenciából elegendő szakasz (és, ha szükséges, egy vagy több vázszekvencia-aminosav is) emberi vázszekvenciákba van beillesztve, így az antitest képes kötődni a CD23-molekulához.

Alkalmas módon, a találmány szerinti antitest CDR-jei a fent leírt L1-L3 könnyűlánc-CDR-ek és H1-H3 nehézlánc-CDR-ek. Azonban, e CDR aminosav-szekvenciáit meg lehet változtatni. Minden egyes CDR aminosav-szekvenciáját aminosav helyettesítéssel, inzercióval és/vagy delécióval lehet megváltoztatni.

Ezért minden egyes CDR tartalmazhat egy vagy két aminosav helyettesítést, inzerciót és/vagy deléciót. Legfeljebb három aminosav helyettesítés, inzerció és/vagy deléció lehet a könnyűlánc-CDRL3-ban, illetve a nehézlánc-CDRH3-ban. Legfeljebb négy aminosav helyettesítés, inzerció és/vagy deléció lehet a könnyűlánc CDRL1-ben. Legfeljebb hat aminosav helyettesítés, inzerció és/vagy deléció lehet a nehézlánc CDRH2-ben. Előnyösen, minden egyes CDR aminosav-szekvenciája lényegében homológ minden egyes, az előbb felsorolt, a CDR-ben megtalálható releváns résszel.

A szekvencia-azonosság foka előnyösen legalább 50%, még előnyösebben legalább 75%. Legelőnyösebb a legalább 90% vagy a legalább 95% szekvencia azonosság.

Mindazonáltal a szakember számára ismert, hogy szekvenciaazonosság magas foka nem feltétlen követelmény, hiszen számos aminosavat gyakran helyettesíteni lehet más, hasonló tulajdonságokkal bíró aminosavakkal, anélkül, hogy egy protein bizonyos tulajdonságait lényegesen megváltoztatnánk, vagy nem kívánt irányba befolyásolnánk. Ezeket a változtatásokat néha „konzervatív" aminosav csere néven emlegetik. Így, a glicin, valin, leucin vagy izoleucin gyakran helyettesíthetik egymást. Az egyéb aminosavak, melyeket gyakran egy másikkal szoktak helyettesíteni, magukban foglalják a következőket: fenilalanin, tirozin és triptofán (aromás oldalláncot tartalmazó aminosavak); lizin, arginin és hisztidin (savas oldalláncot tartalmazó aminosavak); és cisztein, illetve metionin (amid oldalláncot tartalmazó aminosavak). Így, a „származék" kifejezés olyan aminosavszekvencia változatot is jelenthet, mely változat az említett szekvencia viszonylatában egy vagy több konzervatív cserét tartalmaz.

Az antitest vázszekvenciája és állandó doménjai előnyösen humán vázszekvencia és humán állandó domének. Előnyösen, az antitest nehézlánca variábilis régiójának vázszekvenciája lényegében véve homológ a humán KOL-protein megfelelő vázszekvenciájával [Schmidt és mtsai., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 713-747 (1983)]. A vázszekvencia viszonylatában a KOL-ra vonatkoztatott

homológia általában 80% esetleg több, például 90% vagy még több, 95% vagy több. Továbbá, a KOL-ban 4. vázszekvencia hetedik aminosava megfelelően Thr vagy Leu, előnyösen Leu. Ez az aminosav a Kabat és mtsai. (1987) számozása szerinti 109-es KOL aminosav. Számos aminosav-helyettesítés, -inzerció és/vagy -deléció lehet jelen. Például, a 49., 66., 76., 77. és 94. pozíciókban levő, egy vagy több aminosavat meg lehet változtatni az egéreredetű antitest megfelelő aminosavára. A kötődés helyreállítására további lehetséges cseréket lehet végrehajtani a vázszekvenciában a 27., 30., 48., 67., 71., 91. és 93. aminosavakon. Az aminosavakat Kabat és mtsai. szerint (mint fent) számozzuk.

Az antitest könnyűláncán lévő variábilis régió vázszekvenciája, jellemzően, lényegében homológ a HSIGKVII protein variábilis doménjének vázszekvenciájával [EMBL adatbázis: Klobeck, EMBL data library, benyújtva 1986. Április 7.-én]. Ebben a szekvenciában a 452 pozícióban leolvasókeret-elmozdulás („frameshift") van. A leolvasókeret helyreigazítása végett a 452 (T) bázist töröltük.

A homológia a vázszekvencia tekintetében általában 80%-os, illetve a kiválasztott szekvencia tekintetében több, például 90% vagy több, vagy 95% vagy több. Számos aminosav helyettesítés, inzerció és/vagy deléció is jelen lehet, például - a Kabat és mtsai. szerinti számozás alapján - a 64-es aminosav mellett, vagy a helyett a 71-es aminosav esetében.

A találmány tárgyát képezi egy olyan antitest is, amely a 3. és 4. ábrán közzétett variábilis nehézlánc- és

könnyűlánc-szekvenciákat (a szekvencialistában 17. és 18. azonosítószámokon megadott szekvencia) tartalmazza.

Az antitestnek, előnyösen, a természetes antitesttel, illetve annak egy fragmentumával, megegyező vázszekvenciája van. Ezért, az antitest a komplett antitest mellett magában foglalhat $(Fab')_2$-fragmentumot, Fab-fragmentumot, dimer könnyűláncot vagy dimer nehézláncot. Az antitest lehet IgG, mint például IgG1, IgG2, IgG3 vagy IgG4; vagy IgM, IgA, IgE vagy IgD, illetve ezek módosított változata. Az antitest nehézláncának állandó doménjeit ennek alapján választjuk ki. A könnyűlánc állandó doménje kappa, vagy lambda állandó domén lehet.

Az állandó régiót a kívánt funkció szerint választjuk ki. Rendes körülmények között egy IgG1 a komplementhez való kötődésen keresztül lítikus képességet mutat és az ADCC-ben (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*, antitestfüggő sejt-citotoxicitás) közvetítő szerepet tölt be. Amennyiben nem citotoxikus tulajdonságú, gátló antitestre van igény, egy IgG4 az előnyös. Azonban, az IgG4 antitestek az előállítás során instabilak és ezért talán előnyösebb az általában stabilabb IgG1-et módosítani. A javasolt módosításokat az EP0307434 európai közzétételi iratban írtak le. A 235-ös és 237-es pozíciókon végrehajtott módosítások tartoznak az előnyösek közé. A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti antitest lítikus és nem lítikus formája.

Az antitest mindegyik láncát CDR-helyettesítéssel állíthatjuk elő. A humán antitest könnyűlánca és nehézlánca variábilis régiójának CDR-jeit az anti-CD23 antitest minden

egyes CDR-jéből származó, elégséges aminosav-szekvenciával helyettesítjük úgy, hogy a kapott antitest képes legyen a CD23 molekulához kötődni. Egy humán antitestlánc CDR-kódoló DNS-régióit, amelyek az ún. hipervariábilis régiót kódolják, helyettesítjük a kívánt CDR-eket kódoló DNS-el. Amennyiben szükséges, ezt a megváltoztatott DNS-t az antitestlánc állandó doménjét kódoló DNS-hez kapcsoljuk. A DNS-t expressziós vektorba klónozzuk. Az expressziós vektort a kompatibilis gazdasejtbe visszük be, és az antitestláncot expresszáljuk. Az ily módon ko-expresszált komplementer antitestláncok humanizált antitestté állnak össze.

Egy monoklonális antitest humanizálása négy lépésből áll, melyek a következők:

(1) A kiindulási antitest könnyű- és nehézlánc domének nukleotid- és megjósolt aminosav-szekvenciájának meghatározása;

(2) a humanizált antitest megtervezése, azaz el kell dönteni, hogy az antitest vázszekvenciájának melyik régióját alkalmazzuk a humanizációs folyamatban;

(3) az aktuális humanizálási módszertan/technikák; és

(4) a humanizált antitest transzfekciója és expressziója.

Ezért, a találmány tárgyát képezi antitestláncot kódoló DNS-szekvencia, mely a következő szekvenciákból egyet vagy többet tartalmaz:

CDRL1, a 3. ábra szerinti 70-117-es számú bázispárok (a szekvencialistában a 4. azonosítószámú szekvencia)

CDRL2, a 3. ábra szerinti 163-183-as számú bázispárok (a szekvencialistában a 6. azonosítószámú szekvencia)

CDRL3, a 3. ábra szerinti 280-306-os számú bázispárok (a szekvencialistában a 8. azonosítószámú szekvencia)

CDRH1, a 4. ábra szerinti 91-105-ös számú bázispárok (a szekvencialistában a 10. azonosítószámú szekvencia)

CDRH2, a 4. ábra szerinti 148-204-es számú bázispárok (a szekvencialistában a 12. azonosítószámú szekvencia)

CDRH3, a 4. ábra szerinti 301-309-es számú bázispárok (a szekvencialistában a 14. azonosítószámú szekvencia)

illetve az olyan antitestláncot kódoló DNS-szekvencia, amely a 3. vagy 4. ábra szerinti szekvenciák egyikét vagy mindkettőt tartalmazza (a szekvencialistában a 17. és a 18. azonosítószámú szekvencia, illetve a szekvencialistában a 48. és a 49. azonosítószámú szekvencia).

1. Lépés: Az antitest könnyű- és nehézlánc domének nukleotid- és megjósolt aminosav-szekvenciájának meghatározása

Antitest humanizálásához elég ismerni az antitest nehéz- és könnyűlánc variábilis doménjeinek aminosav-szekvenciáját. Az állandó domének szekvenciája lényegtelen, mivel ezek az újraformázási folyamatban nem vesznek részt. Egy antitest variábilis doménjeinek aminosav-szekvenciáját legegyszerűbben a nehéz- és könnyűlánc variábilis doméneket kódoló, klónozott cDNS-ből határozhatjuk meg.

Adott antitest nehéz- és könnyűláncának variábilis doménjeit kódoló cDNS klónozására két, általános eljárás használatos: (1) konvencionális cDNS könyvtárból kiinduló

eljárás, illetve (2) a polimeráz-láncreakció. Mindkét eljárás széles körben ismert. Miután a cDNS-ek nukleotid szekvenciáját megadtuk, ezt az információt könnyen le lehet fordítani az antitest variábilis doménjeinek megjósolt aminosav-szekvenciájára. A jelen esetben, a rágcsálóeredetű C11-antitestlánc nukleotid-szekvenciáját és megjósolt aminosav-szekvenciáját az 1. és 2. ábrán mutatjuk be (a szekvencialistában 1. (nehézlánc) és 2. (könnyűlánc) azonosítószámon megadott szekvenciák, illetve a szekvencialistában 46. és 47. azonosítószámon megadott szekvenciák).

2. Lépés: a humanizált antitest megtervezése

Annak eldöntéséhez, hogy a humanizálás során melyik humán antitest-szekvenciát alkalmazzuk, számos tényezőt kell figyelembe venni. A könnyű- és nehézláncok humanizálása ugyan egymástól független folyamat, azonban alapjában véve mindkettő hasonló elven történik.

Ez a szelekciós folyamat a következő ésszerű magyarázaton alapul: egy adott antitest antigén-specificitását és -affinitását elsődlegesen a variábilis régió CDR-jeinek aminosav-szekvenciája határozza meg. A variábilis domén vázszekvenciájának maradék részei kevéssé vagy egyáltalán nem játszanak ebben közvetlen szerepet. A vázszekvencia-régiók elsődleges szerepe a helyes térbeli orientációban tartani a CDR-eket az antigén felismeréséhez. Így a rágcsálóeredetű CDR-eknek humán variábilis domén vázszekvenciájába történő behelyettesítése valószínűleg nem változtatja meg ezek helyes térbeli orientációját, amennyiben a humán variábilis domén vázszekvenciája jelentősen homológ

azzal a rágcsálóeredetű variábilis doménnel, ahonnan ezek a CDR-ek származnak. Előnyösen tehát olyan humán variábilis domént kell választani, amely jelentősen homológ a rágcsálóeredetű variábilis doménnel(ekkel).

Alkalmas humán variábilis domén-szekvenciát a következők szerint választunk ki:

1. Számítógép-program alkalmazásával végigkeressük az összes elérhető protein- (és DNS-) adatbázist a rágcsálóeredetű antitest variábilis doménjeivel leginkább homológ humán antitest variábilis domén-szekvenciákra. Az e célra alkalmas program kimenete egyrészt a rágcsálóeredetű antitesttel leginkább homológ szekvenciák listája, és emellett minden szekvenciára nézve a százalékos homológia, illetve minden egyes szekvencia és a rágcsálóeredetű szekvencia összerendezése. Ezt az analízist mind a nehéz-, mind pedig a könnyűlánc variábilis doménjének szekvenciáira, egymástól függetlenül végezzük. A fenti analízis sokkal könnyebben kivitelezhető, ha csak humán immunglobulin-szekvenciák részvételével történik.

2. Katalogizáljuk a humán antitest variábilis doménjének szekvenciáit és homológia szempontjából összehasonlítjuk őket. A nehézlánc eléggé variábilis CDR3-ja kivételével, az összehasonlítást elsődlegesen a CDR-ek teljes hosszában végezzük. A humán nehézláncokat, illetve a Kappa és Lambda könnyűláncokat alcsoportokba soroljuk: 3 nehézlánc-alcsoportba, 4 Kappa lánc-alcsoportba, 6 Lambda lánc-alcsoportba. CDR-ek mérete minden egyes alcsoporton belül hasonló, azonban az egyes alcsoportok között eltér. A

homológiát tekintve, rágcsálóeredetű antitest CDR-t általában hozzá lehet illeszteni a humán alcsoportok egyikéhez. Ezután aminosav-szekvencia homológia szempontjából összehasonlítjuk a hasonló hosszúságú CDR-eket tartalmazó antitesteket - elsősorban a CDR-eken belül, de az azokat körülvevő vázszekvencia-régiók viszonylatában is. A leginkább homológ, humán variábilis domént választjuk a humanizációhoz vázszekvenciának.

3. Lépés: Az aktuális humanizálási módszertan/technikák

Az EPA-A-0239400 európai közzétételi irat szerint valamely antitest humanizálható a kívánt CDR-ek humán vázszekvenciába történő átültetésével. Eszerint tehát elő lehet állítani olyan, a kérdéses átalakított antitestet kódoló DNS-szekvenciát, amely azzal a humán DNS-el kezdődik, aminek a CDR-jeit át kívánjuk alakítani. A kívánt CDR-eket tartalmazó, rágcsálóeredetű antitest variábilis doménjének aminosav-szekvenciáját összehasonlítjuk a kiválasztott humán antitest variábilis doménjének szekvenciájával. Megjelöljük azokat a humán variábilis doménban lévő aminosavakat, melyeket a rágcsálóeredetű antitestben a megfelelő aminosavra ki kell cserélni ahhoz, hogy a humán variábilis régió a rágcsálóeredetű CDR-ekkel egybeépüljön. Feltehetőleg lesznek még olyan aminosavak, amelyeket helyettesíteni, hozzáadni vagy kitörölni kell a humán szekvenciából.

Abból a célból, hogy a humán variábilis domén vázszekvencia tartalmazza a kívánt aminosavat, mutagenezist végzünk az e célra szintetizált oligonukleotidokkal. Az em-

lített oligonukleotidok bármilyen, erre alkalmas méretűek lehetnek. Rendes körülmények között az oligonukleotidok hosszát az elérhető speciális DNS-szintetizátor kapacitása korlátozza. Az *in vitro* oligonukleotid által irányított mutagenezis eljárás jól ismert.

Esetleg, a humanizáció kivitelezhető a WO92/07075 nemzetközi közzétételi irat szerinti rekombináns polimeráz-láncreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) alkalmazásával. E metodológia alkalmazásával a CDR összeillesztés ("splicing") útján a a humán antitest vázszekvenciájának két régiója közé kerülhet.

Általánosságban, a WO92/07075 nemzetközi közzétételi irat szerinti módszert úgy lehet kivitelezni, hogy egy, a két humán vázszekvencia régiót, az „AB" és „CD" régiókat, és a kettő között egy CDR (amelyet egy donor CDR-el fogunk helyettesíteni) tartalmazó templátot használunk. Az „A" és „B" láncindítók alkalmazásával amplifikáljuk az „AB" vázszekvencia régiót, és a „C" és „D" láncindítók alkalmazásával amplifikáljuk az „CD" vázszekvencia régiót. Azonban, 5' végükön a „B" és „C" láncindítók további, a donor CDR szekvenciának vagy legalábbis egy részének megfelelő szekvenciát is tartalmaznak. A „B" és „C" láncindítók elégséges hosszúságban fednek át ahhoz, hogy egymás 5' végeinél fogva történő hibridizáció („annealing") lehetővé váljék a PCR kivitelezéséhez szükséges körülmények között. Így az amplifikált „AB" és „CD" régiók az átfedéses lánchosszabbodás révén gén-összeillesztődésen („splicing") mehetnek keresztül, így egy lépésben humanizált termék keletkezik.

4. Lépés: Az átalakított antitest transzfekciója és expresszálása

Az antitest átalakítását célzó mutagenezist követően, a mutagenizált DNS-t megfelelő, könnyű- vagy nehézlánc állandó régióit kódoló DNS-hez lehet kapcsolni, expressziós vektorba lehet klónozni és azzal gazdasejteket, előnyösen emlős sejteket, lehet transzfektálni. Ezeket a lépéseket rutinszerűen lehet végrehajtani. Átalakított antitestet a következő lépéseket tartalmazó eljárással lehet előállítani:

(a) replikációra képes első expressziós vektor elkészítése, mely egyrészt megfelelő, működésképesen az Ig nehéz- vagy könnyűlánca variábilis doménjének legalább egy részét kódoló DNS-szekvenciához kapcsolt promotert, másrészt humán antitestből származó vázszekvencia régiót magában foglaló variábilis domént, és a találmány szerinti humanizált antitesthez szükséges CDR-eket tartalmaz;

(b) replikációra képes második expressziós vektor elkészítése, mely megfelelő, működésképesen a komplementer Ig nehéz- vagy könnyűlánca variábilis doménjének legalább a variábilis doménjét kódoló DNS-szekvenciához kapcsolt, promotert tartalmaz;

(c) sejtvonal transzformálása az első vagy mindkét elkészített vektorral; és

(d) az említett transzformált sejtvonal tenyésztése az említett megváltoztatott antitest előállítása céljából.

Előnyösen, az (a) lépés szerinti DNS-szekvencia mind a variábilis domént, mind pedig a humán antitestlánc állandó doménjét, illetve minden egyes állandó doménjét kódolja. A humanizált antitestet feltárhatjuk és tisztíthatjuk. A megváltoztatott antitest előállítására transzformált sejtvonal lehet egy aranyhörcsög ovárium (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) sejtvonal, vagy egy immortalizált emlőssejtvonal, mely előnyösen nyirokeredetű, mint például egy myeloma, hibridoma, trioma vagy quadroma sejtvonal. A sejtvonal állhat normális nyiroksejtből is, mint például a B-sejt, melyet egy vírussal (mint például az Epstein-Barr vírus) történ transzformálással immortalizálttá alakítottunk. Legelőnyösebben, az immortalizált sejtvonal myeloma sejtvonal, vagy ennek származéka. Az előszeretettel választott expressziós rendszer a WO87/04462 nemzetközi közzétételi iratban leírt glutamin-szintetáz expressziós rendszer.

Bár a humanizált antitest előállítására alkalmazott sejtvonal előnyösen emlős sejtvonal, bármilyen más sejtvonal, mint például bakteriális sejtvonal vagy élesztő sejtvonal, is alkalmazható esetleg. Egyedülálló antitestláncok előállítására szóba jöhet az *E. coli* eredetű bakteriális törzsek esetleges alkalmazása. Az előállított antitestet funkcionalitás szempontjából megvizsgáljuk. Amennyiben a funkcionalitás elvész, vissza kell térni a (2) lépéshez és meg kell változtatni az antitest vázszekvenciáját.

A találmány tárgyát egyrészt a találmány szerinti antitestet kódoló, illetve annak expressziójára adaptált DNS-t tartalmazó expresziós vektor képezi, másrészt pedig az említett expressziós vektorokkal transzformált gazdasejtek.

Miután expresszáltattuk a komplett antitesteket, ezek dimerjeit, egyedülálló könnyű- és nehézláncait, vagy más, a találmány szerinti, immunglobulin formákat, ezeket a technikában ismert eljárások szerint meg lehet tisztítani. Az ilyen eljárások magukban foglalják a következőket: ammónium-szulfáttal végzett kicsapás, affinitás-oszlop, oszlopkromatográfia, gél-elektroforézis és hasonlók [lásd általában: Scopes, „Protein purification", kiad.: Springer-Verlag, New York (1982)]. Gyógyászati alkalmazásra, lényegében tisztának tekinthető immunglobulinok előnyösen legalább 90-95%-ban homogének, legelőnyösebben 98-99%-ban homogének. Miután kívánalmaknak megfelelően részlegesen, vagy homogenitásig tisztítottunk, valamely antitest alkalmassá válik gyógyászati célokra, illetve szűrővizsgálati eljárások kifejlesztésére és elvégzésére, immunfluorescens festésre, és hasonlókra [lásd általában: „Immunological methods", I. és II. kötet, szerk.: Lefkovits és Pernis, kiad.: Academic Press, New York, N.Y. (1979 és 1981)].

Az antitest működhet úgy, hogy blokkolja a membránhoz kötött CD23 és valamely hozzá kötődő ligandum közötti kölcsönhatást. Ilyen blokkoló hatást, *in vitro* szűrővizsgálatokkal, mint például radioimmunológiai vizsgálatokkal lehet tanulmányozni. Az antitest oldható CD23 megkötésével is működhet. Membránhoz kötött CD23-ról ismert, hogy a sejtfel-

színről történő lehasítása számos, oldható fragmentum kialakításához vezet. E fragmentumoknak citokinszerű aktivitása van és az IgE kialakításában lényeges szerepet játszanak. Ezért némely betegséggel együttjár az oldható CD23 túlzott mennyiségben való jelenléte. E fragmentumok megkötésével a találmány szerinti antitestek beavatkozhatnak az oldható CD23 hatásmechanizmusába. Úgy gondoljuk, hogy a találmány szerinti antitestek meggátolják az oldható CD23 keletkezését azzal, hogy meggátolják a membránhoz kötött receptor lehasítását. Ezért, a találmány tárgyát képezi valamely anti-CD23-antitest alkalmazása az oldható CD23 kialakulását gátló gyógyászati készítmény gyártásában.

Bármilyen antitest hatásának kifejtése függ a célantigénhez való affinitásától. A találmány szerinti antitestek a CD23-receptorra nézve magas affinitást mutatnak. Az ilyen antitestek affinitási állandója előnyösen nagyobb, mint $Ka = 1*10^{9}\ M^{-1}$, illetve előnyösebben nagyobb, mint $Ka = 1*10^{10}\ M^{-1}$. Ezért, a találmány tárgyát olyan antitestek képezik, melyek a CD23-receptort, illetve az oldható CD23-at $Ka = 1*10^{9}\ M^{-1}$ értékkel egyenlő, vagy annál nagyobb affinitási állandóval jellemzett kötéssel kötik.

CD23-receptort kötő antitesteket *in vivo* alkalmazni lehet gyulladásos, illetve autoimmun betegségek megelőzésében vagy kezelésében. Ennek nagy jelentősége van, hiszen adott tény, hogy e betegségek közül sokat bonyolult vagy lehetetlen hatékonyan kezelni, dacára e betegségek természetes okaival foglalkozó tudomány régóta fennálló múltjának. Ez a helyzet az arthritisre vonatkozóan fokozottan

igaz. Az arthritis gyakran érinti a középkorú embereket és kényszerítve őket a munka, idő előtti feladására. Az arthritis hatékony kezelése számos kutatócsoport régóta fennálló célja.

Úgy hisszük, hogy a találmány szerinti antitestek alkalmasak számos betegség megelőzésére vagy kezelésére, mely betegségek közé soroljuk a következőket: arthritis, lupus erythematosus, Hashimoto-féle pajzsmirigy-gyulladás, sclerosis multiplex, cukorbetegség, uveagyulladás, bőrgyulladás, sömör, csalánkiütés, nephrosisos tünetegyüttes, glomerulonephritis, gyulladásos bélbetegség, fekélyes vastagbélgyulladás, Crohn-féle betegség, Sjogren-féle szindróma, allergiák, asztma, sokkal specifikusabban: allergiás vagy valódi asztma, akut asztmatikus roham, az orrnyálkahártya gyulladása, ekcéma, GVH, COPD, insulitis, hörghurut (különösen a krónikus hörghurut), illetve cukorbetegség (különösen az 1 típusú cukorbetegség).

Ezért a találmány tárgyát képezi a találmány szerinti antitest alkalmazása a fenti rendellenességek bármelyikének vagy többnek a kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény gyártásában. A találmány tárgyát képezi továbbá a fenti rendellenességek bármelyikének vagy többnek a kezelésére szolgáló olyan eljárás, amely tartalmazza a találmány szerinti antitest, gyógyászatilag hatékony dózisban történő adagolását.

A találmány szerinti antitestek alkalmasak lehetnek a CD23 és különböző ligandumok közötti, például a CD23 és a CD21 közötti, a CD23 és a CD11b közötti, a CD23 és a CD11c

közötti, a CD23 és egy 80-85 KDa molekulatömegű, endotéliumsejt protein (amely lehet egy 80 vagy 85 KDa molekulatömegű, endotéliumsejt protein) közötti, illetve a CD23 és egy 115 KDa molekulatömegű protein (amelyről azt gondoljuk, hogy a 80-85 KDa molekulatömegű, endotélium-proteinnel hozható kapcsolatba) közötti kölcsönhatások tanulmányozására. Úgy gondoljuk, hogy fenti kölcsönhatások közül egy vagy több *in vivo* is előfordul. Olyan antitestek, illetve más, kötőtulajdonságot mutató hatóanyagok, amelyek képesek ezeket a kölcsönhatásokat blokkolni, különösen előnyösek, mivel úgy gondoljuk, hogy ezek különösen alkalmasak lehetnek citokinek által közvetített gyulladásos hatások csökkentésére vagy enyhítésére. Ezek az anyagok alkalmasak lehetnek B-sejtek olyan malignus elváltozásai ellen, mint például a krónikus limfocita leukémia és a hajas sejtes leukémia.

Valamely anti-CD23 terápia egy másik lehetséges hatásmechanizmusa magában foglalhatja egy IgE immunválasz blokkolását.

A találmány szerinti antitesteket az allergén betegségek - ideértve a nem IgE által közvetített betegségeket is - kezelésében, illetve megelőzésében is speciálisan alkalmazhatók. Ezek az antitestek alkalmazhatók a fekélyes vastagbélgyulladás megelőzésében és kezelésében. Ezek az antitestek alkalmazhatók a Crohn-féle betegség megelőzésében és kezelésében is.

A találmány szerinti antitestek alkalmazhatók önmagukban vagy *immunszupresszív hatóanyagokkal*, mint például szteroidok, ciklosporin; *antitestekkel*, mint például egy

anti-limfocita antitest; vagy előnyösebben egy, *toleranciát indukáló, anti-autoimmun vagy gyulladásgátló hatóanyaggal*, mint például egy CD4+T-sejt gátló hatóanyag, így egy anti-CD4 antitest [előnyösen egy blokkoló vagy nem gyengítő („non-depleting") antitest], vagy egy anti-CD8 antitest, mint például egy TNF antagonista, így anti-TNF antitest vagy TNF-inhibitor, például oldható TNF receptor; esetleg olyan *hatóanyagokkal*, mint amilyenek az NSAID-ok kombinálva.

A találmány szerinti anyag alkalmazható dózisa különböző faktoroktól függ. Ilyen faktorok például a kezelendő betegség vagy elváltozás, az adagolás útja, illetve a kezelendő személy kora és testtömege. Anélkül, hogy bármilyen speciális dózist határoznánk meg, úgy gondoljuk, hogy például parenterális adagolásként a találmány szerinti antitest (ami általában egy gyógyászati készítmény részeként van jelen, ahogyan azt fent jeleztük) 0.01-20 mg/kg napi dózisa alkalmas lehet egy átlagos felnőtt kezelésére. Ennél alkalmasabb dózis lehet a 0,1-5 mg/kg közötti dózis, mint például a 0,1-2 mg/kg. Az egységnyi dózis alkalmas módon 1-400 mg.

Az antitesteket elkülönülten adagolásra kerülő, kemoterápiás vagy immunszupresszív hatóanyagokat is tartalmazó összetételekként beadva is lehet alkalmazni. A jellemző hatóanyagok közé tartozik a ciklosporin A vagy valamilyen purinanalóg (például metotrexát, 6-merkaptopurin, vagy hasonlók), de számos további, a szakember által jól ismert

hatóanyag (például ciklofoszfamid, prednizon, stb.) is alkalmazható.

Amennyiben azt sejtet, amelyikhez az antitest kötődik, lizálni szükséges, a találmány szerinti antitest valamilyen immuntoxin részét alkothatja. Az immuntoxinok különösen alkalmasak a kiválasztott sejtek *in vitro* vagy *in vivo* elpusztítására. Egy immuntoxit két komponens jellemez, melyek egyike olyan citotocikus hatóanyag, amely - amennyiben kötődik vagy adszorbeálódik - általában a sejtre nézve végzetes. A második komponens, mely „szállító eszközként" („delivery vehicle") ismert, biztosítja a toxikus hatóanyag eljuttatását egy kérdéses sejttípushoz, mint például rákos daganatsejtekhez. A két komponenst rendszerint valamelyik jól ismert kémiai eljárás egyikével létrehozott kémiai kötéssel kapcsolják egymáshoz. Például, amennyiben a citotoxikus hatóanyag egy protein és a második komponens egy intakt immunglobulin, a kötést létre lehet hozni valamilyen hetero-bifunkcionális, keresztkötő vegyülettel, például SPDP-vel, karbodiimiddel, glutáraldehiddel, vagy hasonlókkal. A különböző immuntoxinok előállítása a technikában jól ismert, például ilyet találhatunk a „Monoclonal antibody-toxin cunjugates: Aiming the magic bulet" című közleményben [Thorpe és mtsai., „Monoclonal antibodies in clinical medicine" 168-190, kiad.: Academic Press (1982)].

Számos citotoxikus hatóanyag alkalmas immuntoxinokban történő felhasználásra. Citotoxikus hatóanyagok közé sorolhatjuk a *radionuklidokat*, mint például jód-131, yttrium-90, rhénium-188 és bizmut-212; számos, *kemoterápiában alkalma-*

*zott hatóanyagot*, mint például vindezin, metotrexát, adriamicin és ciszplatin; *valamint a citotoxikus proteineket*, mint például riboszómát gátló proteinek, mint amilyen a fehér zászpából („pokeweed") származó antivirális protein, *Pseudomonas* exotoxin A, ricin, diftéria-toxin, ricin „A" lánc, stb.; illetve *a sejt felszínén aktív hatóanyagokat*, mint például a foszfolipáz enzimeket (például foszfolipáz C) [lásd általában: Olsnes és Phil, „Chimaeric toxins", Pharmac. Ther., 25, 335-381 (1982) és „Monoclonal antibodies for cancer detection and therapy", 159-179, 224-266, szerk.: Baldwin és Byers, kiad.: Academic Press (1985)].

Az immuntoxin szállító komponense valamely, a találmány szerinti antitest. Intakt immunglobulinok, vagy ezek kötő fragmentumai, mint például a Fab, előnyösen alkalmazhatók. Jellemzően, az immuntoxinban levő antitestek lehetnek humán IgA, IgM vagy IgG izotípusok, azonban amennyiben szükséges, egyéb emlős állandó régiók is alkalmazhatók.

A találmány tárgyát képezi továbbá gyógyászati készítmény, mely gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot vagy oldószert és, aktív összetevőként, találmány szerinti antitestet tartalmaz. A készítmény tartalmazhatja a találmány szerinti immuntoxint. A találmány szerinti antitest, az immuntoxin és az ezeket tartalmazó gyógyászati készítmény különösen alkalmas parenterális, azaz szubkután, intramuszkuláris vagy intravénás adagolásra.

A parenterális adagolásra alkalmas készítmény általában az antitest oldatát vagy ennek egy, elfogadható vivőanyagban, előnyösen vizes alapú vivőanyagban feloldott koktélját tartalmazza. Számos vizes vivőanyag alkalmazható, például víz, pufferelt víz, 0,4%-os sóoldat, 0,3%-os glicerin, és hasonlók. Ezek steril és általában a szemcsés anyagoktól mentes oldatok. Ezeket az készítményeket konvencionális, jól ismert sterilizációs eljárásokkal sterilizálhatjuk. A készítmények tartalmazhatnak olyan, gyógyászati szempontból elfogadható kiegészítő anyagokat, melyek az élettani körülmények biztosításához szükségesek, mint például a pH beállításához és a pufferéléshez szükséges hatóanyagok, a toxicitás beállításához szükséges hatóanyagok, és hasonlók, például nátrium-acetát, nátrium-klorid, kálium-klorid, kalcium-klorid, nátrium-laktát, stb. Az antitest koncentrációja ezekben a formulációkban széleskörben változhat, például kevesebb, mint 0,5%-tól általában 1%-tól, vagy legalább 1%-tól egészen 15 vagy 20%-ig (tömegszázalékban). A kérdéses adagolási módtól függően, az antitest koncentrációját általában elsődlegesen a folyadéktérfogat, viszkozitás, stb. alapján választjuk ki.

Így, egy jellemző, intramuszkuláris adagolásra készített gyógyászati készítmény 1 ml steril, pufferelt vízből és 50 mg antitestből áll. Egy jellemző, vénán keresztül történő infúziós adagolásra készített gyógyászati készítmény 250 ml steril *Ringer*-féle oldatból és 150 mg antitestből áll. A parenterális úton adagolható készítmények előállítására szolgáló aktuális eljárások ismertek vagy nyilván-

valóak a szakember számára, illetve részletesen le vannak írva például a „Remington's Pharmaceutical Science" kiadványban (15. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)).

Tárolási célra a találmány szerinti antitestek liofilizálhatók és az alkalmazás előtt a megfelelő vivőanyaggal adagolásra előkészíthetők. Ez az eljárás hatékonynak bizonyult a konvencionális immunglobulinokkal kapcsolatban. Bármilyen alkalmas liofilizálási és előkészítése módszer alkalmazható. Szakember számára világos, hogy a liofilizálás és az előkészítés változatos arányú antitestaktivitásvesztéshez vezethet (például, a konvencionális immunglobulinok tekintetében, az IgM antitestek nagyobb mértékű aktivitásvesztésre hajlamosak, mint az IgG antitestek), így a veszteség kompenzálására az alkalmazási szinteket be kell állítani.

A készítményeket egyszeri vagy többszöri adagolással lehet bevinni olyan dózisban és időbeli eloszlás szerint, amit a kezelőorvos választ ki. Bármely esetben, a gyógyászati célú formulációnak, a találmány szerinti antitest(eke)t a megfelelő mennyiségben kell biztosítani ahhoz, hogy a páciens hatékony kezelésben részesüljön.

Továbbá, a találmány szerinti antitestek széles körben alkalmazhatók *in vitro*. Például, a példaként szolgáló antitesteket hasznosíthatjuk T-sejt tipizálásban, specifikus, CD23-antigént hordozó sejtek, illetve a receptor fragmentumainak izolálásában, vakcina elkészítésben, és hasonlókban.

Diagnosztikai célokra az antitesteket jelezhetjük is. Jelzetlen antitesteket egyéb, a humanizált antitesttel reagáló, jelzett antitestekkel (második antitest, amely, például a humán immunglobulin állandó régióira specifikus) kombinálva alkalmazhatjuk. Esetleg az antitesteket közvetlenül jelezhetjük. A jelölések számos változata alkalmazható, például a radionuklidok, fluorok, enzimek, enzim szubsztrátumok, enzim kofaktorok, enzim inhibitorok, ligandumok (különösen a haptének), stb. Számtalan, különböző típusú immunológiai vizsgálat alkalmazható, amelyek a szakember számára jól ismertek.

A találmány tárgyát képezik azok a kitek is, amelyeket - a találmány szerinti antitest alkalmazásával - kiválasztott antigén ellen, vagy kiválasztott antigén celluláris aktivitásának vagy jelenlétének kimutatására használunk. Így, a találmány szerinti antitestet - általában konténerbe, liofilizált formában - egymagában, vagy más, a kívánt sejttípusra specifikus további antitestekkel együtt, szerelhetjük ki. A kitek a jelzéshez vagy toxinhoz konjugált, vagy nem konjugált antitestek mellett tartalmaznak puffereket, mint például Tris, foszfát, karbonát, stb., stabilizálókat, biocideket, semleges proteineket, mint például a szérum albumin, vagy hasonló, és használati utasítást. Általában ezek az anyagok, az aktív antitest-mennyiségéhez viszonyítva, kevesebb, mint körülbelül 5 tömeg%-ban vannak jelen, és általában, az antitest koncentrációhoz viszonyítva, a teljes mennyiségük legalább 0,001 tömeg%-ot tesz ki. Gyakran kívánatos, hogy a kit tartalmazzon

semleges töltőanyagot vagy kötőanyagot az aktív hatóanyag hígítására. Amennyiben ilyen kötőanyag jelen van, a teljes készítménynek 1-99 tömeg%-át teheti ki. Ahol a vizsgálatban az antitest kimérát megkötő második antitest is alkalmazásra kerül, ezt a második antitestet külön fiola tartalmazza. A második antitestet jellemzően jelzéshez konjugáljuk és a fent leírt antitest formulációval analóg módon szereljük ki.

Ábrák

Az 1. ábra az egéreredetű C11-nehézlánc variábilis régiójának az aminosav- és nukleotid-szekvenciáját ábrázolja.

A 2. ábra az egéreredetű C11-könnyűlánc variábilis régiójának az aminosav- és nukleotid-szekvenciáját ábrázolja.

A 3. ábra a humanizált anti-CD23 nehézlánc variábilis régiójának az aminosav- és nukleotid-szekvenciáját ábrázolja.

A 4. ábra a humanizált anti-CD23 könnyűlánc variábilis régiójának az aminosav- és nukleotid-szekvenciáját ábrázolja.

Az 5. ábra a kiméra CD23 IgG1m-nek a maximális érték felénél mért kötődését ábrázolja.

A 6. ábra a humanizált CD23 IgG1m-nek a maximális érték felénél mért kötődését ábrázolja.

A találmányt a következő példákon keresztül mutatjuk be.

A C11 egéreredetű anti-CD23 monoklonális antitest klónozása és szekvenálása

Általános metodológia

Hacsak másként nem jeleztük, a következő standard eljárásokat és körülményeket alkalmaztuk. Ahol alkalmazható volt, a gyártó által javasolt protokolt követtük. A restrikciós emésztést és más rutin molekuláris biológiai eljárást lényegében a Maniatis és mtsai. által leírtak [„Molecular cloning - a laboratory manual", 2. Kiadás, Cold Spring Harbour Press] szerint végeztük.

A PCR-t programozható hőciklus-berendezéssel (Trio, Biometra) végeztük. Egy jellemző 100 µl-es reakcióelegy a következőket tartalmazta: 2,5 egység AmpliTaq polimeráz (Perkin-Elmer-Cetus, Beaconsfield, UK) abban a pufferben, amit a gyártó biztosított, 250-250 µM dATP, dCTP, dGTP, és dTTP, 1-1 µM az amplifikáláshoz szükséges láncindítóból és a templát DNS-ből. Hacsak másként nem jeleztük, a következő ciklust alkalmaztuk:

0. lépés: 95°C 5 percig

1. lépés: 95°C 1 percig

2. lépés: 50°C 1 percig, amely 0,4°C/s sebességgel lecsökken a 3 lépés hőmérsékletére

3. lépés: 72°C 1 percig, vissza az 1 lépéshez, a folyamat 30-szor ismétlődik

4. lépés: 72°C 5 percig

A DNS-szekvenálást a dideoxi-terminátor eljárással végeztük a *Sequenase v2* rendszer (USB, Cambridge, UK) vagy a fluorescens festék-terminátor rendszer (ABI) alkalmazásával.

A DNS gélen történő tisztítását alacsony olvadáspontú agarózon (NuSieve GTG, FMC, Rockland, ME) történt elválasztással végeztük. A kiválasztott fragmentumot UV megvilágítás mellett a gélből kivágtuk, és a DNS-t az agarózból *Wizard PCR Preps* reagenskészlettel (Promega, Southampton, UK) vontuk ki.

Az antitestláncokban az aminosav-csoportok számozása a Kabat és mtsai. által felállított rendszert [„Sequences of proteins of immunological intereset", US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987)] követve történt.

A cDNS előállítása a C11 hibridomából

Az RNS extrakcióját C11 sejtek szaporodó kultúrájából végeztük. $1,3*10^7$ sejtet tartalmazó kultúrát lecetrifugáltuk és mind a sejtüledéket, mind pedig a felülúszót analízis céljaira megtartottuk. A felülúszót egy immunológiai eljárással (ISO1 kit, Sigma, Poole, UK) a különböző egér immunglobulin izotópok jelenlétére megvizsgáltuk és a talált C11 monoklonális antitest IgG1 izotípusnak bizonyult.

A sejtüledékből hírvivő RNS-t állítottunk elő *Total RNA Isolation Kit* (Stratagene, Cambridge, UK)(a teljes RNS előállítására) és *mRNS Purification Kit* (Dynal, Oslo, Norvégia) egymás utáni alkalmazásával. A mRNS- és a teljes RNS-mintákat *Superscript Preamplification System* (BRL,

Paisley, Scotland, UK) rendszerrel egyesszálú cDNS-sé alakítottunk. A kapott cDNS mintákat a PCR-ben arra alkalmaztuk, hogy a C11 immunglobulin nehéz- és könnyűláncainak variábilis régióit külön-külön amplifikáljuk.

A C11 nehézlánc variábilis régióinak klónozása és szekvenálása

A nehézláncot a Bendig és Jones [BioTechnology 9, 88-89 ()] által kidolgozott eljárás egy módosított változata szerint klónoztuk. E szerint, a teljes variábilis régió PCR-ben történő amplifikálásra 12 darab, a nehézláncot kódoló jel szignálpeptid régiójára specifikus előre láncindítót és 1 darab, az egéreredetű γ1 állandó régiójára specifikus, vissza láncindítót alkalmaztunk. Ahelyett, hogy mind a 12 előre láncindítót egyetlen reakcióhoz adtuk volna, inkább 12 külön-külön történt PCR reakciót végeztünk, melyek mindegyikében egy-egy előre láncindítót kombináltunk a γ1 vissza láncindítóval. E reakciókat 42,5°C hibridizálási („annealing") hőmérsékleten végeztük (a fenti rendszer szerinti 2. lépés).

Minden egyes reakcióból mintát vettünk és agaróz gélen elemeztük. A várt méretű sávot csak azon reakció esetében láttuk, amelyben az MHV11 előre láncindítót alkalmaztuk. Ezen eredmény alapján, két PCR reakciót végeztünk az MHV11-el és a γ1 vissza láncindítóval, melyekben a mRNS-ből, illetve a totál RNS-ből származó cDNS-t alkalmaztuk. Két független PCR-reakció futtatása a klónozáshoz szükséges anyag előállítására a szakember számára ismert, és szokásos

eljárás, mellyel elkerülhetők azok a szekvenciahibák, melyeket a Taq-polimeráz nukleotidbeépítés-tévesztése okoz.

A kapott PCR-fragmentumokat *Xma*I és *Sal*I-el emésztettük, gélen tisztítottuk és pUC18-vektorba klónoztuk. Az inzerteket tartalmazó, az egyes PCR-ekből származó klónokat megszekvenáltuk és azonosnak találtuk. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a szekvencia nem tartalmaz PCR folyamat által generált hibákat. A variábilis régió teljes DNS-szekvenciáját az 1. ábra tartalmazza (a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia), és tökéletesen illeszkedik a *Kabat*-féle IIIC Csoport nehézlánc konszenzus szekvenciához.

A C11 könnyűlánc variábilis régióinak klónozása és szekvenálása

A C11 könnyűlánc variábilis régiót az előzőhöz hasonló módon klónoztuk. 11 darabból álló, a könnyűláncot kódoló jel szignálpeptid régiójára specifikus „előre" („forward") láncindító készletet és 1 darab, az egéreredetű κ állandó régiójára [Bending és Jones, mint fent] specifikus, vissza láncindítót alkalmaztunk. Ezenfelül, miután a korábbi megfigyeléseink során kiderült, hogy ez a láncindító-készlet nem eléggé hatékony az összes egéreredetű kappa könnyűlánc amplifikálására, egy másik, itt MKV12-nek nevezett, láncindítót (szekvencia: 5'-ACT AGT CGA CAT GAA GTT TCC TTC TCA ACT TAT GCT C-3', a szekvencialistában 41. azonosítószámon megadott szekvencia) vezettünk be. A fentiek szerint, külön-külön PCR-reakciókat végeztünk, melyek mindegyikében egy előre láncindítót és a κ állandó régióra specifikus

„vissza" („reverse") láncindítót alkalmaztunk. A termékeket agaróz-gélelektroforézissel analizáltuk.

A reakciók közül három eredményezett a várt méretnek megfelelő termékeket. Ezeket külön-külön *Sal*I és *Xma*I restrikciós enzimekkel emésztettük, és pUC18-vektorba történő klónozás eredményeként három, VKI, VKJ és VKK néven elnevezett klónt kaptunk. Ezeket az azonosítás céljából részlegesen megszekvenáltuk. A VKI klón részleges szekvenciája azonosnak bizonyult egy már ismert, a MOPC21 mielómából (ahol a CDR3-ban egy leolvasásikeret-eltolódás van) (GenBank M35669) származó könnyűlánc szekvenciájával, így a VKI klónt a további vizsgálatokból kivontuk. A VKK klón, beleértve a CDR3-at is, részleges szekvenciája azonosnak bizonyult a már sikeresen átrendeződött MOPC21 könnyűlánccal (GenBank J00560, J00552). Miután az embrionális állapotnak megfelelő elrendezésben mindkét könnyűláncban megtalálható a CDR3, ez a megfigyelés még nem zárja ki eleve önmagában azt, hogy a VKK klón tartalmazza a helyes C11 könnyűláncot. Azonban, miután adott, hogy a hibridóma myeloma őse MOPC21 származékként ismert, illetve egy másik, MOPC21-el kapcsolatban álló szekvenciát már azonosítottunk (VKI klón), úgy gondoltuk, hogy a VKK valószínűleg nem korrekt.

A VKJ-klónról tartottuk a legvalószínűbbnek, hogy az igazi C11-könnyűlánc variábilis régiót tartalmazza, miután ennek részleges szekvenciája a GenBank-ban fellelhető egyetlen szekvenciával sem volt azonos. A VKJ-klón teljes szekvenciáját meghatároztuk. Úgy találtuk, hogy a VKJ teljesen funkcióképes könnyűlánc szekvencia, melyben leolva-

sásikeret-eltolódás nincs, és nagyon valószínű, hogy a VK167- vagy a VK24-gént használja, atipikus II. *Kabat*-csoportba tartozó szekvenciaként elhelyezve őket. A VKJ-klón teljes szekvenciáját a 2. ábrán mutatjuk be (a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia). Egy második, az előzőektől független PCR-reakciót is végeztünk, amelyben a VKJ-klónt előállító láncindítópárt alkalmaztuk. A terméket a fentiek szerint klónoztuk és szekvenáltuk, hogy eleve kizárjuk annak lehetőségét, hogy a VKJ-szekvencia PCR-hibákat tartalmazzon. E második amplifikálásból származó klónok szekvenciája az eredeti VKJ-klónnal azonosnak bizonyultak.

Arra, hogy a VKJ tartalmazta a C11-könnyűlánc variábilis régióját a döntő bizonyíték az volt, hogy a kiméra-antitest előállítása során ezt a VK-t és a fent leírt VH-t használtuk, és ez az antitest köti a CD23-at.

**Kiméra-antitest tervezése**

Abból a célból, hogy igazoljuk, hogy a helyes nehéz- és könnyűlánc variábilis régiókat klónoztuk és szekvenáltuk, egy anti-CD23 kimérát készítettünk. A nehézlánc variábilis régióját a cDNS könyvtárból származó klónok alkalmazásával amplifikáltuk. Az előre láncindító tartalmazta az 5' klónozó helyet (*Hind*III), az 5' nem transzlált szekvenciát ideértve a funkcionális Kozac jelet az egéreredetű variábilis nehéz régió első hat kodonjával együtt. A vissza láncindító egy *Spe*I helyet vitt be a 4. vázszekvenciába leolvasókeretbe illesztve azért, hogy fuzionáltatni lehessen egy humán gamma I állandó régióval. E láncindítók al-

kalmazásával egy 430 bázispár hosszúságú terméket állítottunk elő.

Nehézlánc anti-CD23 kiméra PCR oligonukleotidok

5′-gAT gAA gCT TTA CAg TTA CTC AgC ACA CAg gAC CTC ACC ATg gAT TTT ggg CTg ATT-3′ (a szekvencialistában 19. azonosítószámon megadott szekvencia)

5′-gAT ggA CTA gTg TCC CTT ggC CCC A-3′ (a szekvencialistában 20. azonosítószámon megadott szekvencia)

A kiméra könnyűláncainak előállítására szolgáló anti-CD23 könnyűlánc variábilis régiók amplifikálására olyan láncindítókat készítettünk, melyek tartalmazzák az 5′ klónozó helyet (*HindIII*), az 5′ nem transzlált szekvenciát ideértve a funkcionális Kozac jelet az egéreredetű variábilis nehéz régió első hat kodonjával együtt. A vissza láncindító tartalmaz egy *BsiW1* helyet és antikodont a jelzett aminosavra. A redundancia kódot standardok: Y=T vagy C; K=T vagy G; V=A, G vagy C. A termék 210 bázispár.

Könnyűlánc anti-CD23 kiméra PCR oligonukleotidok

5′-gATgAAgCTTTACAgTTACTCAgCACACAggACCTCACCATgAggTTCT CTgTTCAg-3′ (a szekvencialistában 21. azonosítószámon megadott szekvencia)

5′-gATgCgTACgTYTKATYTCCAVCTTKGT-3′ (a szekvencialistában 42-45., illetve 52 és 53 azonosítószámon megadott szekvenciák)

TRKIELKT

R V

A nehézláncból kapott PCR-termékeket tisztítottuk, *Hind*III-al és *Spe*I-el hasítottuk, azután humán gamma I állandó régiót tartalmazó, *Hind*III-al és *Spe*I-el hasított pUC-vektorba klónoztuk. Az alkalmazott humán állandó régió a Reichman és mtsai. által leírt [Nature 322, 323-327 (1988)] IgG1 nehézlánc volt, de a Page és Sydenham [Biotechnology 9, 64-68 (1991)], illetve a Crowe és mtsai. [Clin. Exp. Immunol. 87, 105 (1992)] leírtak szerint cDNS-sel összefüggésben.

A variábilis és az állandó régiót a vektorból *Hind*III és *EcoR*I-el történt emésztéssel vágtuk ki és ezután a pEE6 expressziós vektor (Celltech) *Hind*III - *EcoR*I helyére klónoztuk [Stephens és Cockett, Nucl. Acid Res. 17, 7110 (1989)].

A kiméra nehézláncának megszekvenálását követően kiderült, hogy az 5' szekvenciából egy 100 bázispár hosszúságú szakasz hiányzik. Az egéreredetű variábilis nehézlánc szekvenciájának vizsgálata során egy belső *Hind*III helyet találtunk. A PCR-ben generált termékekből a nehézlánc teljes variábilis szekvenciáját is megkapjuk, a PCR terméket *Hind*III-al emésztettük és a kis, 100 bázispár hosszúságú fragmentumot egy, a kiméra-anti-CD23 nehézláncát tartalmazó, *Hind*III-al emésztett pEE6 plazmidba klónoztuk.

A könnyűláncból kapott PCR-termékeket tisztítottuk, majd *Hind*III-al és *BsiW*1-el hasítottuk és ezután egy, a humán kappa állandó régiót tartalmazó pUC-vektorba klónoztuk. Az alkalmazott humán kappa állandó régió a Reichman és mtsai. által leírt [Nature (1988) mint fent] régió volt. A

könnyűlánc variábilis és állandó régiót a pUC-vektorból *Hind*III-al és *Eco*RI-el vágtuk ki. Ezt a fragmentumot a pEE12 expressziós vektor (Celltech) *Hind*III - *Eco*RI helyére klónoztuk [Bebbington és Hentschel, „DNA cloning" 3. köt., 8. fej., IRL Press (1987)].

A kiméra nehézláncát *Bgl*II - *Sal*I kazettaként izoláltuk és a pEE12 könnyűlánc plazmid *BamH*I - *Sal*I helyére illesztettük be, így a könnyű- és a nehézlánc gének egyazon plazmidba kerültek.

A kiméra CD23-at tartalmazó végső expressziós plazmidot tranziensen, COS sejtekben (zöld majom vesesejtjei) expresszáltuk a következőképpen. 1 mg/ml Transfectamot (Promega) készítettünk elő a gyártó által javasoltak szerint. A transzfekció előtt egy nappal, lyukanként $5*10^5$ sejtet lemezeltünk ki egy hatlyukú lemezre (Costar) 2,5 ml össztérfogatú médiumban. A médium 10% dializált foetális borjúszérumot (Hyclone) tartalmazó, Dulbecco-féle módosított Eagle-médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco/BRL) médium volt. A hatlyukú lemez minden egyes lyukához, egy steril polisztirol miniatűr tartóedényben 0,5 ml szérummentes médiumhoz 20 µl *Transfectam*-ot adtunk, és gyengén vortexeltük. Minden egyes transzfektálásra kerülő lyukhoz 4 µg plazmid DNS-t adtunk a 0,5 ml, a Transfectamot tartalmazó, szérummentes médiumhoz, majd jól összekevertük és szobahőmérsékleten 10 percig, azaz ameddig a sejteket a transzfekcióra előkészítettük, állni hagytuk. A transzfektálásra kerülő sejtekről a médiumot leszívtuk, majd a sejteket 1-szer vagy 2-szer, lyukanként 5-5 ml elő-

melegített médiummal óvatosan leöblítettük, ezután minden egyes lyukhoz 0,5 ml szérummentes médiumot adtunk. Minden egyes lyukhoz 0,5 ml előre elkészített DNS/*Transfectam* oldatot adtunk, és miután ezt mindegyik lyukkal elvégeztük - az összekeveredés biztosítására - a lemezt gyengéden, körkörösen mozgatva kervertettük. A lemezt az inkubátorban 4 órán keresztül inkubáltuk. A komplett médiumból (a szérum koncentrációja a normálisnál 1,5-szer magasabb) 2 ml-t adtunk a transzfekciós oldathoz. A lemezeket három napig inkubáltuk az inkubátorban, majd a lemezekről a médiumokat összegyűjtöttük, és antitest-aktivitásra nézve megvizsgáltuk.

ELISA-vizsgálatban a kiméra-antitest kötötte az sCD23-at. Az sCD23 kötésének megállapítására szolgáló ELISA-vizsgálat céljából EIA/RIA lemezeket (Costar) 12 órán keresztül, 4°C-on, bevontunk 100 µl/lyuk térfogatú, 2 µg/ml koncentrációjú, karbonát pufferben (35 mM $NaHCO_3$, 15 mM $Na_2CO_3$, pH 9,3) oldott sCD23-al. A lemezeket TBS/Tween-pufferrel (50 mM Trizma base, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, pH 7,4) háromszor mostuk, 1-2 órán keresztül 22°C-on blokkoltuk 100 µl/lyuk térfogatú, 2%-os, TBS/Tween-ben oldott borjú szérumalbuminnal, és TBS/Tween-el háromszor mostuk.

Egy 96 lyukú lemez egyik részébe 100 µl/lyuk térfogatban, különböző arányban hígított, egéreredetű C11 hibridóma-felülúszókat mértünk, míg a lemez másik részébe a COS sejtek felülúszójába tranziensen expresszált kiméra anti-CD23 antitestek különböző arányban hígított oldatát

pipettáztuk. Az egéreredetű C11-antitestet, PBS/BSA-ban (1% borjú szérumalbumin) 1:1000 arányban hígított, kecskében termeltetett anti-egér IgG (teljes molekula) peroxidáz konjugátummal mutattuk ki. A kiméra anti-CD23 antitestet PBS/BSA-ban (1%) 1:5000 arányban hígított, anti-humán kappa könnyűlánc (kötött és szabad) peroxidáz konjugátummal (Sigma, A-7164) mutattuk ki. Az sCD23 kötését tekintve ELISA-ban a kiméra anti-CD23 pozitívnak bizonyult.

Ahogyan azt FACS analízissel kimutattuk, a kiméra anti-CD23 szintén pozitívnak bizonyult a membrán CD23 kötését tekintve. Ezek az adatok igazolták, hogy a korrekt egéreredetű C11 nehéz-és könnyűlánc variábilis régióját klónoztuk és szekvenáltuk. Ezeket az egéreredetű szekvenciákat alkalmaztuk a humanizált anti-CD23 antitest kifejlesztésére.

Humanizált nehéz- és könnyűlánc-gének konstrukciója

A humanizált nehéz- és könnyűlánc géneket a következő, Lewis és Crowe által leírt [Gene, 101, 297-302 (1991)] eljárással készítettük el.

(i) Könnyűlánc

Az egéreredetű vázszekvencia variábilis szekvenciáit összehasonlítottuk a GenBank-ben található humán vázszekvenciákkal.

A humán könnyűlánc vázsszekvenciáit homológia szempontjából összehasonlítottuk az egéreredetű anti-humán anti-CD23 könnyűlánc vázszekvenciáinak variábilis részével. A PCR-rel végzett átfedéses lánchosszabbításhoz templátként

a következő, leginkább homológnak bizonyult humán vázszekvenciát választottuk:

Lokusz: HSIGKVII 490 bp mRNS

Meghatározás: Humán kappa-immunoglobulin leader peptid- és variábilis régiót kódoló, átrendeződött DNS

Forrás: Homo sapiens

Szerzők: Klobeck, H.G. és mtsai., Contribution of human V kappa II germ-line genes to light chain diversity, Nature 309, 73-76, 1984

Megvizsgáltunk minden egyes olyan aminosav-eltérést, melyet azonos pozícióban találtunk mind az egéreredetű, és mind pedig a humán vázszekvenciában. Miután az emberi aminosav-csoportok várhatóan kevésbé immunogének, mint az egéreredetű aminosav-csoportok, ezért minden olyan esetben, amikor egy kérdéses aminosav-csoport az antigén kötését nem befolyásolta, a humán aminosav-csoportot tartottuk meg. Az antigén-kötést befolyásoló, specifikus aminosav-csoportokat más antitest-antigén kölcsönhatások alapján, elméleti úton határoztuk meg. A publikált adatok szerint, a nehézláncban a 71, 91 és 94-es aminosav-csoportokról kimutatták, hogy az antigén-kötésben szerepet játszanak [Tramontano, Chothia, és Lesk, J. Mol. Biol. 215, 175-182 (1990); Kettleborough, Saldanha, Heath, Morrison, és Bendig, Protein Eng. 4, 773-783 (1991)]. Ezért ezek az aminosav-csoportoknak mind a humán, és mind pedig az egéreredetű vázszekvenciában azonosnak kell lenniük. Minden egyes aminosav-csere esetében figyelembe vettük a méretet, a hidrofobicitást, a hidrofilicitást, és a töltést. Amennyiben e jellemzők tekintetében a

humán aminosav hasonlított az egéreredetű aminosavra, a kérdéses helyen a humán aminosavat alkalmaztuk.

Aminosav-szekvencia tekintetében, az egéreredetű könnyűlánc vázszekvencia variábilis régiója és az azzal leginkább homológ humán könnyűlánc vázszekvencia variábilis régiója között 13 különbséget találtunk. Az egéreredetű aminosavak közül egyiket sem tartottuk meg. Miután generáltuk a humanizált könnyűlánc vázszekvencia variábilis régióját, GCG programot alkalmaztunk a következő enzimek „*silent*" (csendes) restrikciós helyeinek azonosítására:

*Acc*I, *Hae*I, *Nhe*I, *Pvu*II, *Xba*I, *Xho*I, *Xma*I.

Az említett restrikciós helyek bevitelére a nukleotid-szekvencián változtatásokat végeztünk, amely változtatások azonban az aminosav-szekvenciát nem érintették. Ezeket a vágóhelyeket azért építettük be, hogy megkönnyítsük a PCR klónok fragmentumainak vágását és áthelyezését.

A humanizált variábilis könnyűláncot - „*splice overlap*" PCR alkalmazásával [Crowe, és mtsai., mint fent] - az egéreredetű könnyűlánc CDR-eknek egy már meglévő, a kiválasztott humán könnyűlánc vázszekvenciát tartalmazó templátba (például HSIGKVII [Klobek és mtsai., Nature 309, 73-76 (1984)]) ültettük át. A humanizált könnyűlánc variábilis szekvenciáit kódoló plazmidokat a következőben leírtak szerint készítettük el:

A könnyűlánc templátszekvenciájába egy, a transzkripcióhoz szükséges, *Kozac*-féle szekvenciát és egy szignálszekvenciát (MGWSCIILFLVATATGVHS, a szekvencialistában 15. azonosítószámon megadott szekvencia) építettünk be. A

klónozáshoz a PCR termék 5′ végéhez egy *Hind*III helyet, a 3′ végéhez pedig egy *Bswi*I helyet adtunk. A PCR átfedéses lánchosszabbításhoz szükséges oligonukleotidok a következők voltak:

$A_L$: a szekvencialistában 23. azonosítószámon megadott szekvencia: 5′-gAT CAA gCT TCT CTA Cag TTA CTg AgC ACA-3′

$B_L$: a szekvencialistában 24. azonosítószámon megadott szekvencia: 5′-AAT CAA gTA TgT CTT CCC ATC CTT ATA Cag gAg ACT CTT ACT CgA gCg ACA ggA gAT ggA ggC-3′

$C_L$: a szekvencialistában 25. azonosítószámon megadott szekvencia: 5′-CgC TCg AgT Aag AgT CTC CTg TAT Aag gAT ggg Aag ACA TAC TTg AAT Tgg TAC CTg Cag Aag-3′

$D_L$: a szekvencialistában 26. azonosítószámon megadott szekvencia: 5′-TgA TgC CCg ggT ggA CAT CAA ATA gAT Cag gAg CTg-3′

$E_L$: a szekvencialistában 27. azonosítószámon megadott szekvencia: 5′-TTg Atg TCC ACC Cgg gCA TCA ggg gTC CCT gAC Agg-3′

$F_L$: a szekvencialistában 28. azonosítószámon megadott szekvencia: 5′-AgC CAC CTg Acg TTT gAT CTC CAC CTT ggT CCC TTg gCC gAA CgT gAA Tgg ATA CTC TAC Cag CTg TTg ACA gTA ATA AAC CCC-3′

A PCR reakciókat [Saiki és mtsai., Science 239, 487-491 (1988)] programozható fűtőblokk-termosztátban (Perkin-Elmer, GeneAmp 9600), 25 hőmérséklet ciklus (94°C 1 perc, 50°C 2 perc, és 72°C 3 perc) és az azt követő végső, 72°C-on 5 percig tartó lépés alkalmazásával végeztük. A gyártó javaslata szerint a láncindítókat (mindegyik 40μM koncentrá-

cióban), egy meghatározott mennyiségű templátot, és 2,5 egység Taq polimerázt (Perkin-Elmer-Cetus) reakció-pufferben 50µl végtérfogatban használtuk.

A három elsődleges PCR reakció kivitelezése során, 10 ng/reakció templátot, és az $A_L$-$B_L$, a $C_L$-$D_L$, és az $E_L$-$F_L$ láncindító-párokat alkalmaztuk. E PCR reakciók termékeit, azaz a megfelelő $AB_L$, $CD_L$ és $EF_L$ fragmentumokat, Qiaguick PCR Purification Kit-el (Qiagen Ltd, Surrey, UK, termékszám: #28104) a gyártó által megadott használati utasítást követve tisztítottuk. A tisztított $AB_L$ és $CD_L$ fragmentumok egy-egy tizedét összekevertük. E keverékkel, és az $A_L$ és $D_L$ láncindítókkal rekombináns PCR reakciót végeztünk. E reakció termékét, az $AD_L$ fragmentumot, a fentiek szerint tisztítottuk. A tisztított termék egy tizedét összekevertük a tisztított $EF_L$ egy tizedével. E keverékkel és az $A_L$ és $F_L$ láncindítókkal rekombináns PCR reakciót végeztünk. A végső, a humanizált könnyűláncot tartalmazó, rekombináns PCR reakció termékét, az $AF_L$-t, egy *„TA Cloning Kit"*-ből származó *pCR™II*-be (InVitrogen BV, Leek, The Netherlands, termékszám: #K2000-01) ligáltuk a gyártó által javasolt protokolt követve. A plazmid izolátumokat ABI fluorescens szekvenáló berendezésben megszekvenáltuk.

(ii) Nehézlánc

Nehézláncként a következő, az egéredetű vázszekvenciával leginkább homológ, humán vázszekvenciát azonosítottuk:

Lokusz: HSIGVS 423 bp mRNS

Meghatározás: Humán Ig mu-lánc mRNS V3b-D-J4 régiójának 5'-vége

Forrás: Homo sapiens cDNS mRNS-ben

Szerzők: Sanz, I. és mtsai, VH sequence of a human autoantibody. Evidence that autoantibodies can be unmutated of germline genes. J. Immunol. 141, 883-887 (1989)

Az aminosav-szekvencia tekintetében az egéreredetű nehézlánc variábilis vázszekvenciája és az azzal leginkább homológ humán nehézlánc variábilis vázszekvenciája között tizenhét különbséget találtunk. A 49., 66., 76., 77., és 94. pozíciókban levő öt aminosavat megtartottuk, míg a többi pozícióban a humán aminosavakat alkalmaztuk a humanizált nehézlánc vázszekvenciában.

Egy sor humanizált nehézlánc szekvenciát generáltunk és GCG program alkalmazásával meghatároztuk a következő enzimek *„silent"* helyeit:

*Eag*I, *Nhe*I, *Xba*I, *Xho*I, *Xma*I

Az említett restrikciós helyek bevitelére a nukleotidszekvencián változtatásokat végeztünk, amely változtatások azonban az aminosav-szekvenciát nem érintették. Ezeket a vágóhelyeket azért építettük be, hogy megkönnyítsük a PCR klónok fragmentumainak vágását és áthelyezését.

A humanizált nehézlánc variábilis régió szekvenciájának 5'-végéhez a klónozáshoz HindIII restrikciós helyet, a transzkripció iniciálására *Kozac*-szekvenciát, és szignálszekvenciaként egéreredetű szignál-szekvenciát (MAWVWTLLFL-MAAAQSAQA, a szekvencialistában 16. azonosítószámon megadott szekvencia) adtunk. Klónozáshoz a 3'-véghez SpeI restrikciós helyet adtunk.

Az egéreredetű CDR-eket tartalmazó humanizált nehézlánc vázszekvencia felépítését - hosszú, átfedő oligonukleotidok alkalmazásával - PCR-rel végeztük. A következő nyolc, körülbelül 60 bázispár méretű (15 bázispár méretű átfedő szakasszal) oligonukleotidot szintetizáltuk:

$A_H$: a szekvencialistában 29. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-ACA CgA AgC TTC ACC ATg gCT Tgg gTg Tgg ACC TTg CTA TTC CTg ATg gCg gCC gCC CAA-3'

$B_H$: a szekvencialistában 30. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-CTT TAC CAA gCC TCC CCC AgA CTC CAC CAg CTg CAC CTC TgC TTg ggC ACT TTg ggC ggC CgC CAT-3'

$C_H$: a szekvencialistában 31. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-TTg gTA AAg CCC ggg ggg TCC CTT AgA CTC TCC TgT gCA gCT AgC ggA TTC ACT TTC AgT-3'

$D_H$: a szekvencialistában 32. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-CCC CTT CCC Tgg AgC CTg gCg gAC CCA ggA CAT CCA gTA gCC ACT gAA AgT gAA TCC gCT-3'

$E_H$: a szekvencialistában 33. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-ggg AAg ggg CTC gAg Tgg gTT gCT gAA ATT AgA TTg AAA TCT gAT AAT TAT gCA ACA CAT-3'

$F_H$: a szekvencialistában 34. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-ATC ATC TCT TgA gAT ggT gAA TTT CCC CTT CAC AgA CTC CgC ATA ATg TgT TgC ATA ATT-3'

$G_H$: a szekvencialistában 35. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-ATC TCA AgA gAT gAT TCA AAA TCT AgA CTg TAT CTg CAA ATg AAC AgC CTg AAA ACC gAg gAC ACA-3'

$H_H$: a szekvencialistában 36. azonosítószámon megadott szekvencia. 5'-ggT gAC TAg TgT TCC CTg gCC CCA gTC TAT gAA ATC TgT ACA gTA ATA CAC ggC TgT gTC CTC ggT TTT-3'

Az egéreredetű CDR-eket a templátba ültettük rekombináns PCR alkalmazásával. A PCR-t programozható hőciklizáló berendezéssel (Trio, Biometra) végeztük. Ötven µl reakcióelegy tartalma a következő volt: 2,5 egység *AmpliTaq* polimeráz (Perkin-Elmer-Cetus, Beaconsfield, UK) a gyártó által szolgáltatott pufferben, amely puffer az amplifikáláshoz előnyös pH-t és ionerősséget biztosította (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl és 1,5 mM $MgCl_2$), 200-200 µM dATP, dCTP, dGTP és dTTP, 1-1 µg/µl amplifikációs láncindító. A mintákat a fűthető termosztát-blokkban 94°C-on melegítettük 2 percig, azután 30 mp-ig 16.000 * g-vel centrifugáltuk. A mintákat egy percig jégen inkubáltuk, majd Taq polimerázt és egy csepp ásványi olajat adtunk minden egyes mintához. A mintákat vortexeltük, majd 30 mp-ig 16.000 * g-vel centrifugáltuk. A mintákat a következőképpen programozott hőciklizáló berendezésbe helyeztük:

1. Lépés: 94°C 1 percig

2. Lépés: 50°C 2 percig, amely 0,4°C/s sebességgel emelkedik a 3 lépés hőmérsékletére

3 lépés: 72°C 1 percig, vissza az 1 lépéshez, a folyamat 25-ször ismétlődik.

Eredetileg hét elsődleges PCR-reakciót végeztünk, amelyekben 1-1 µl amplifikációs láncindító volt a következő kombinációkban: $A_H$ és $B_H$, $C_H$ és $D_H$, $E_H$ és $F_H$, $G_H$ és $H_H$; $A_H$ $B_H$ $C_H$ és $D_H$ $E_H$ $F_H$ $G_H$ és $H_H$; $A_H$ $B_H$ $C_H$ $D_H$ $E_H$ $F_H$ $G_H$ és $H_H$. Az elsődle-

ges PCR reakciótermékek 1-1 µl-ét láncindítókkal (1 µg/µl) kombináltuk és az elsődleges PCR reakciók esetében alkalmazottal megegyező reakció körülmények mellett PCR reakciókat végeztünk abból a célból, hogy előállítsunk a teljes hosszúságú nehézlánc variábilis régiót. Az elsődleges PCR reakciókban keletkezett $AF_H$ és $EH_H$ fragmentumokat, $AH_H$ fragmentumot, $AB_H$ $G_H$ és $AH_H$ fragmentumokat, $AB_H$ $CD_H$ $EF_H$ és $GH_H$ fragmentumokat, $AB_H$ $CD_H$ $EF_H$ $GH_H$ és $AH_H$ fragmentumokat $A_H$ és $H_H$ láncindítókkal kombináltuk. A PCR reakció mindegyike során teljes hosszúságú fragmentumok keletkeztek. Az $AB_H$ $G_H$ és $AH_H$ reakcióban keletkezett, humanizált nehézlánc variábilis régiót tartalmazó PCR terméket *Wizard PCR Preps DNS Purification System*-el (Promega), a gyártó által javasolt protokol szerint tisztítottuk. A tisztított terméket *Hind*III-al és *Spe*I-el vágtuk, és mutáns IgG1 állandó régióját tartalmazó pUC-vektorba klónoztuk (lásd lejjebb).

A humanizált antitest előállítása

A humanizált nehézlánc variábilis régiót tartalmazó PCR termékeket *Hind*III-al és *Spe*I-el vágtuk, és mutáns IgG1 állandó régióját tartalmazó pUC-vektorba klónoztuk (lásd lejjebb). A klónok variábilis régióját megszekvenáltuk (lásd 3. és 4. ábrák, a szekvencialistában 17. és 18. azonosítószámon megadott szekvenciák). Kiválasztottuk a korrekt aminosav-szekvenciájú, humanizált nehézlánc variábilis régiót tartalmazó klónt. Ebben a klónban - a modell humanizált nehézlánc variábilis régió szekvenciájához képest - egyetlen „silent" nukleotid csere volt.

A humanizált nehézlánc állandó régiójának forrásául olyan mutáns IgG1 szolgált, amelyben a mutáció révén a C1q és az Fc kötési képesség eliminálódott. A C1q és az Fc kötési képesség eliminálódását okozó mutációk kivitelezése a következő két publikáción alapult: Duncan és Winter, Localization of the C1q binding site in antibodies by surface scanning. Nature 332, 738-740 (1988) és Duncan, Woolf, Partridge, Burton, és Winter, Localisation of the binding site for human FcR1 on IgG. Nature 332, 563-564 (1988).

A mutált aminosavakat a következő publikáció tartalmazza: Kabat, Wu, Perry, Gottesman és Foeller, Sequences of proteins of immunological interest, 1. köt., 680.

Nem citotoxikus IgG1 izotípus létrehozására a következő változtatásokat végeztük el az IgG1-en: 248. Leu(CTg)-t Ala(gCg)-re és 250. Gly(ggA)-t Ala(gCA)-ra.

Ezeket a mutációkat humán IgG1-en végzett helyspecifikus (*„site directed"*) mutagenezissel végeztük az alábbiak szerint:

Mutációkat tartalmazó IgG1 előállítására a következő *állandó régió PCR oligonukleotidokat* alkalmaztuk:

$A_c$: a szekvencialistában 37. azonosítószámon megadott szekvencia. gCT gCT CCT TTT AAg CTT Tgg ggT CAA ggC TCA CTA gTC ACA gTC TCC

$B_c$: a szekvencialistában 38. azonosítószámon megadott szekvencia. TgA Cgg TgC CCC CgC gAg TTC Agg

$C_c$: a szekvencialistában 39. azonosítószámon megadott szekvencia. CCT gAA CTC gCg ggg gCA CCg TCA

$D_c$: a szekvencialistában 40. azonosítószámon megadott szekvencia. AAg CTT CCg TCg AAT TCA TTT ACC Cgg AgA CAg

Az $A_c$ oligonukleotid *Hind/Spe*I helyet tartalmaz. A $B_c$ és $C_c$ oligonukleotidok a 248. és 250. pozícióban mutációkat tartalmaznak. A Dc oligonukleotid *EcoR*I helyet tartalmaz. Az $A_c$ és $B_c$ oligonukleotidok alkalmazásával AB fragmentumot állítottunk elő a bejelentés általános metodológiai részében specifikált PCR kondíciók alkalmazásával templátként humán IgG1 konstans régió szerepelt [Reichman, Clark, Waldman és Winter, Reshaping human antibodies for therapy. Nature 322, 323-327 (1988)]. A $C_c$ és $D_c$ oligonukleotidok alkalmazásával CD fragmentumot állítottunk elő azonos templát és azonos PCR kondíciók alkalmazásával. AB és CD PCR-fragmentumokat Wizard PCR Preps DNS Purification System-el (Promega) tisztítottuk. AB (5,0 µl) és CD (5,0 µl) PCR-fragmentumokat az $A_c$ és $D_c$ oligonukleotidokkal kombinálva generáltuk az AD fragmentumot, amely fragmentum tartalmazza az IgG1 állandó régióját a mutációkkal együtt. Az AD fragmentumot *Wizard PCR Preps DNS Purification System*-el (Promega) tisztítottuk, *Hind*III-al és *EcoR*I-el emésztettük, majd *Hind*III-al és *EcoR*I-el emésztett, a humanizált anti-CD23 nehézláncának variábilis régióját tartalmazó, pEE6 plazmidba ligáltuk.

A humanizált könnyűlánc variábilis régióját tartalmazó PCR termékeket *Hind*III-al és *BsiW*I-el vágtuk, majd a fent leírtak szerint, a humán kappa könnyűlánc konstans régióját tartalmazó pEE12 expressziós plazmidba klónoztuk. A klónokat ABI fluorescens szekvenátorban megszekvenáltuk és

a korrekt, a humanizált könnyűlánc variábilis régiónak megfelelő, aminosav-szekvenciát tartalmazó klónt kiválasztottuk.

Abból a célból, hogy a humanizált nehéz- és könnyűláncot együtt tartalmazó plazmidhoz jussunk, a pEE6 plazmidból származó, humanizált anti-CD23 nehézláncot tartalmazó *Bgl*II - *Sal*I fragmentumot a humanizált anti-CD23 könnyűláncot tartalmazó pEE12 plazmid *BamH*I - *Sal*I helyére ligáltuk. A humanizált nehézlánc variábilis- és konstans régióit, illetve a humanizált könnyűlánc variábilis- és konstans régióit együttesen tartalmazó végső expressziós plazmidot megszekvenáltuk.

Humanizált antitest tranziens expressziója

A humanizált anti-CD23-at tartalmazó plazmiddal COS sejteket transzfektáltunk és tranziensen expresszáltunk az antitest kimérák esetében fent leírtak szerint. A humanizált anti-CD23-at tartalmazó expressziós plazmiddal COS-sejteket transzfektáltunk és tranziensen expresszáltunk az anti-CD23 kiméra tranziens expressziójánál leírtak szerint.

A humanizált, illetve kiméra anti-CD23 antitest esetében, a sCD-23-al kapcsolatos fél-maximális kötést a már leírt sCD23 ELISA alkalmazásával vizsgáltuk. A 405 nm-en mért abszorbanciaértékeket az antitest-koncentrációk függvényében ábrázoltuk abból a célból, hogy megfelelő „illeszkedési jóságú" (*„goodness of fit"*) vagy 1-es korrelációs koefficiensű szigmoid görbét kapjunk. Az abszorbanciát a Molecular Devices cég lemezleolvasó berendezésével (Menlo Park, Calif., USA) mértük és *Softmax* programot (Molecular

Devices Corp.) alkalmaztunk a legjobb illeszkedés (*best fit*) log-logit algoritmussal végzett kiszámítására, illetve görbe, egyenlet paraméterek és korrelációs koefficiens megjelenítésére. A görbeillesztés megvitatása a következő publikációban található: Rogers, „Data analysis in quality control od assays: A practical primer", Practical immunoassays, szerk.: Butt, W.R., Marcel Dekker, Inc., New York (1984). A log-logit logisztikus egyenletekkel kapcsolatos görbeillesztési algoritmus a Levenberg-Marquardt-eljáráson alapult. Ezen eljárás megvitatását az alábbi publikáció tartalmazza: Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolski, S.A. és Vetterling, W.T., „Numerical principles in C: The art of science computing", Cambridge University Press, New York (1988). Az x értékét (ng/ml-ben) az alábbi egyenlettel számítottuk ki:

$$x = cx \ \frac{a-y}{y-d} 1 \ / \ b \qquad (1)$$

ahol

$$y = \frac{d - c}{2} \qquad (2)$$

és ahol

*d* az az *y*-érték, amely az x-tengely magas értékei aszimptotájának felel meg,

*a* az az *y*-érték, amely az x-tengely alacsony értékei aszimptotájának felel meg,

*c* pedig az *a* és *d* közötti felezőpontnak megfelelő *x*-érték, *b* arra jellemző érték, hogy milyen gyors a görbe átmenete az aszimptotából a görbe középpontjába, értéke jellemzően = 1.

A kiméra anti-CD23 sCD23-hoz való kötődésének értéke a görbe maximumának felénél meghatározva 16,28 ng/ml (lásd 5. ábra). A humanizált anti-CD23-nak a maximum felére jellemző kötési állandója 15,03 ng/ml (lásd 6. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a humanizált anti-CD23 kötődési affinitása ekvivalens a komplett egéreredetű C11 variábilis régiót tartalmazó kiméra anti-CD23 affinitásával.

Stabil expresszió

Humanizált ant-CD23-at expresszáló stabil sejtvonalakat válogattunk ki a glutamin-szintetáz gén-amplifikációs rendszer (Celltech) alkalmazásával. A Bebbington és mtsai. által leírt alaprendszert [Biotechnology 10, 169-175 (1992)] követtük. E rendszer szerint oly módon állítunk elő stabil sejtvonalakat, hogy hörcsögeredetű glutamin-szintetázt kódoló cDNS-t - az SV40 korai promoterének szabályozása alatt -, SV40-eredetű *„splicing"* szakaszt, poliadenilációs szignált és az antitest nehéz- és könnyűláncait kódoló cDNS-t elektroporációval emlőssejtbe juttatjuk. Ezután glutaminmentes médiumban a transzfektált, szaporodásra képes sejteket kiválogatjuk. A humanizált anti-CD23 stabil sejtvonalak előállítására NSO-sejteket (*non-immunoglobulin secreting mouse myeloma B cells*, nem immunglobulint szekretáló egéreredetű myeloma B-sejtek) tenyésztettünk 2 mM glutamint (GIBCO/BRL) és 10% foetális borjú

szérumot (Hyclone) tartalmazó, Iscove-féle módosított Dulbecco-médiumban (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma) (nem szelektáló médium). Az anti-CD23 sejteket a következőképpen készítettük. A humanizált anti-CD23-at tartalmazó expressziós plazmidot (40 µg) *Fsp*1-el (New England Biolabs) linearizáltuk, etanollal lecsaptuk és 50 µl steril vízben felszuszpendáltuk. Exponenciális növekedési stádiumban levő NSO sejtek számát megállapítottuk. A sejteket ($10^7$ db) lecentrifugáltuk és foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, Phosphate Buffered Saline) egyszer mostuk. A sejteket 950 µl PBS-ben felszuszpendáltuk. A DNS-t, majd a sejteket - jégen - elektroporációs küvettába (0,4 mm, Bio-Rad) vittük át. A küvettát Bio-Rad elektroporációs berendezésbe helyeztük, és két egymást követő impulzussal (1500 V, 3 µF) kezeltük. A küvettát a berendezésből kivettük és jégre helyeztük. A sejteket nem szelektáló médiummal $10^4$, $10^3$, $10^2$ sejt/ml koncentrációra hígítottuk és 50-50 µl/lyuk térfogatban 96-lyukú lemezre (Costar) lemezeltük. A következő napon 150 µl, 60 µg/ml glutaminsavat (Sigma), 60 µg/ml aszparagint (Sigma), és 7-7 µg/ml-t a következők mindegyikéből: adenozin (Sigma), guanozin (Sigma), citidin (Sigma), uridin (Sigma) és timidin (Sigma), és emellett még 10% foetális borjú szérumot (Hyclone) tartalmazó Iscove-féle módosított Dulbecco-médiumot (Sigma) (szelektáló médium) adtunk mindegyik lyukhoz. A lemezeket visszahelyeztük a 37°C-os inkubátorba és addig inkubáltuk, amíg lényeges sejtpusztulás be nem következett és különálló, túlélő telepek meg nem jelentek. A sejtek által egybefolyóan benőtt

96-lyukú lemezek lyukaiból telepeket vittünk át 24-lyukú lemez egyik lyukába, majd néhány nap múlva a benőtt 24-lyukú lemez lyukából 25 $cm^3$-es flaskát innokuláltunk. A kivett médiumot friss, szelektáló médiummal pótoltuk. Miután a sejteket flaskában tenyésztettük, a tenyészetekben a sejtszámot $10^5$-$10^6$ sejt/ml közötti értéken tartottuk. A legjobban termelő klón kiválasztása céljából, az antitesttermelést összehasonlítására a 144 klón mindegyikében megállapítottuk a specifikus termelési rátát (*Specific Production Rate*, SPR). Az SPR-vizsgálathoz benőtt flaskából $10^6$ sejtet vettünk ki, a sejteket PBS-sel mostuk, azután a sejtekhez 10 ml friss médiumot adtunk és 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A termelt antitest mennyiségét ELISA-val állapítottuk meg.

A klónokat először humán IgG termelésére vizsgáltuk a következő ELISA eljárással. EIA/RIA lemezeket (Costar) bevontunk 100 µl/lyuk térfogatú, 5 µg/ml koncentrációjú, 35 mM $NaHCO_3$ és 15 mM $Na_2CO_3$ tartalmú pufferben (pH 9,3) oldott kecskeeredetű anti-humán IgG-vel (Jackson Immunoresearch Labs, #109-001-003) 12 órán keresztül, 4°C-on. A lemezeket TBS/Tween pufferrel (150 mM NaCl, 50 mM Trizma bázis, 0,1% (v/v) Tween-20, pH 7,4) háromszor mostuk, majd 22°C-on 1-2 órán keresztül, 100 µl/lyuk térfogatú, TBS/Tween-ben oldott 2% borjú szérumalbuminnal blokkoltuk, és ismét háromszor mostuk TBS/Tween-nel. Száz mikroliter kontrol Campath-1H IgG1 [Page és Sydenham, (1991) mint fent] standardot (1000 ng/ml - 1 ng/ml koncentráció-tartományban, kontrol médiumban), illetve felülúszó mintákat adtunk - háromszoros is-

métlésben - a lyukakba és 12 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk. A lemezeket TBS/Tween pufferrel ötször mostuk, majd a lyukakba 100-100 µl, 1:5000 arányban hígított kecskeeredetű anti-humán IgG - alkalikus foszfatáz konjugátumot adtunk és 2 órán keresztül 22°C-on (vagy 12 órán keresztül 4°C-on) inkubáltuk. A lemezeket TBS/Tween pufferrel ötször mostuk, majd a lyukakhoz 100-100 µl 3 mM-os, szubsztrátum pufferben oldott, pNPP-t (Sigma 104-0) adtunk és a lemezeket mikrotiter-lemez leolvasó berendezéssel (Molecular Devices) 405 nm hullámhosszon, 20 perces kinetikai program alkalmazásával vizsgáltuk. A program közvetlenül standard görbéket és mint IgG koncentrációkat számított és készített. Az SPR értékét µg/$10^6$ sejt/24 óra mértékegységben adtuk meg. A 144 klón SPR-jei 14-0 µg/$10^6$ sejt/24 óra tartományban változtak. A legalább 5 0 µg/$10^6$ sejt/24 óra értéket adó sejteket - a már leírt ELISA eljárással - leteszteltük sCD23 kötésére is. Ezekben a tesztekben kiméra CD23-at alkalmaztunk standardként.

Komplement lízis és ADCC szűrővizsgálat

Áramlási citometriás mérésben, FITC-el jelzett, humanizált anti-CD23-at és RPMI 8866 sejteket alkalmaztunk annak igazolására, hogy a CD23 a sejtfelszínen expresszálódik. Ugyanazon sejteket FITC-el jelzett, humanizált anti-CDw52 antitesttel (hCD52) is megfestettük és a sejtek CD52 expressziója szempontjából negatívnak bizonyultak. Ezzel szemben, Wein 133 sejtek hCD52-vel pozitívan, anti-CD23-al viszont negatívan festődtek.

RPMI 8866 sejteket európium-dietilén-triaminopenta-acetáttal (Eu/DTPA), a Wein 133 sejteket viszont szamárium-dietilén-triaminopentaacetáttal festettük a leírt eljárás szerint [Blomberg, J. Immunol. Methods, 168, 267 (1993); Patel és mtsai., J. Immunol. Methods, 184, 29 (1995)]. Jelzett Wein 133 sejtek és RPMI 8866 sejtek egy-egy arányú keverékét mind hCD52-vel, mind pedig anti-CD23-mal lizáltuk NHS - mint a komplement egy forrása - jelenlétében. A komplement hCD52-vel, a klasszikus úton történt aktiválása Sm/DTPA felszabadulást eredményezett. Az anti-CD23 jelenlétében Sm/DTPA felszabadulás nem történt. Ez az eredmény igazolja, hogy csak a hCD52, viszont az anti-CD23 nem, indukálja a Wein 133 sejtek lízisét. Az adatok továbbá igazolják, hogy a komplementrendszer aktiválható, és az aktiválás sejtek lízisét okozza. Ahogyan azt előre láttuk, a hCD52-vel nem szabadítottunk fel Eu/DTPA-t az RPMI 8866 sejtekből. Bár az RPMI 8866 sejtek expresszálnak CD23-at, az anti-CD23 hatására Eu/DTPA nem szabadult fel, ami bizonyítja, hogy az antitest nem képes a komplementet aktiválni.

Megkíséreltük jelzett Wein 133 sejtek és RPMI 8866 sejtek egy-egy arányú keverékének lizálását antitest-függő celluláris citotoxicitás (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC*) segítségével mind anti-CD23, mind pedig hCD52 alkalmazásával perifériális vér mononukleáris sejtek (*Peripherial Blood Mononuclear Cell, PBMC*) jelenlétében. A hCD52 - és nem az anti-CD23 - által kiváltott Sm/DTPA felszabadulást figyeltük meg, ami igazolta, hogy csak az anti-

CD23 nem vesz részt az Wein 133 sejtek ADCC lízisében. Ez nem volt meglepő, mivel a Wein 133 sejtek nem expresszálnak CD23-at. Ez azt sugalmazza, hogy bár áramlási citometriával kimutattuk a CD23-nak RPMI 8866 sejteken történő expresszióját, azonban anti-CD23-al ADCC által közvetített sejtlízist nem figyeltünk meg.

Kinetikai analízis

Az asszociációs rátát, a disszociációs rátát és a humanizált anti-CD23-nak a CD23-hoz való kötődésének konstans disszociációs rátáját *Biacore Biosensor* készülék alkalmazásával számoltuk ki. Röviden, rekombináns CD23-at CM5 szenzor felszínén immobilizáltuk. A dextrán felszínen lévő karboxil-csoportokat 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)karbodiimiddel (EDCO/N-hidroxiszukcimid (NHS)) aktiváltuk. Az aktiválást követően, az immobilizáció megkezdésre rekombináns CD23-at áramoltattunk a felszín felett. A fennmarad aktív csoportok blokkolására etanolamint adtunk a rendszerhez. A szenzor felszínén HBS-pufferrel hígított, humanizált anti-CD23-at áramoltattunk át. Az asszociációs ráta ($M^{-1}sec^{-1}$) megállapítása céljából az anti-CD23-nak az immobilizált CD23-hoz való kötődését követtük nyomon az idő függvényében. A disszociációs ráta ($sec^{-1}$) megállapítása céljából a CD23 - anti-CD23-komplex disszociációját is nyomonkövettük az idő függvényében. A disszociációs állandót (nM) a disszociációs- és asszociációs rátából számítottuk ki. Hat vizsgált minta esetében, a kapott adatok szerint az asszociációs ráták az $1,5\text{-}1,85*10^6$ $M^{-1}sec^{-1}$ tartományba, a disszociációs ráták pedig az 1-2*105 $sec^{-1}$ tarto-

mányba estek. Az anti-CD23-ra vonatkozó disszociációs állandót 8-19 pM közöttinek találtuk. Az affinitási állandó körülbelül Ka = $9*10^{10}$ $M^{-1}$ értéknek adódott.

SZEKVENCIALISTA

(210) 1

(211) 415

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (3) ... (413)

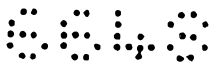
(400) 1

```
aa gct tta cag tta ctc agc aca cag gac ctc acc atg gat ttt ggg    47
   Ala Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Thr Met Asp Phe Gly
     1               5                  10                  15

ctg att ttt ttt att gtt ctt tta aaa ggg gtc cag agt gaa gtg aag    95
Leu Ile Phe Phe Ile Val Leu Leu Lys Gly Val Gln Ser Glu Val Lys
                20                  25                  30

ctt gag gag tct gga gga ggc ttg gtg caa cct gga gga tcc atg aaa   143
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys
            35                  40                  45

ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttt act ttc agt ggc tac tgg atg tct   191
Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Trp Met Ser
        50                  55                  60
```



```
tgg gtc cgc cag tct cca gag aag ggg ctt gag tgg gtt gct gaa att   239
Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile
     65                  70                  75

aga ttg aaa tct gat aat tat gca aca cat tat gcg gag tct gtg aaa   287
Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 80                  85                  90                  95

ggg aag ttc acc atc tca aga gat gat tcc aaa agt cgt ctc tac ctg   335
Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu Tyr Leu
            100                 105                 110

caa atg aac agc tta aga gct gaa gac agt gga gtt tat tac tgt aca   383
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
        115                 120                 125

gat ttc ata gac tgg ggc caa ggg aca cta gt                       415
Asp Phe Ile Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    130                 135
```

(210) 2

(211) 437

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (3) ... (437)

(400) 2

```
aa gct tta cag tta ctc agc aca cag gac ctc acc atg agg ttc tct      47
   Ala Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Thr Met Arg Phe Ser
     1               5                  10                  15

gtt cag ttt ctg ggg gtg ctt atg ttc tgg atc tct gga gtc agt ggg      95
Val Gln Phe Leu Gly Val Leu Met Phe Trp Ile Ser Gly Val Ser Gly
                20                  25                  30

gat att gtg ata acc cag gat gaa ctc tcc aat cct gtc act tct gga     143
Asp Ile Val Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Asn Pro Val Thr Ser Gly
            35                  40                  45

gaa tca gtt tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc ctg tat aag     191
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys
        50                  55                  60

gat ggg aag aca tac ttg aat tgg ttt ctg cag aga cca gga caa tct     239
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
    65                  70                  75

cct cag ctc ctg atg tat ttg atg tcc acc cgt gca tca gga gtc tca     287
Pro Gln Leu Leu Met Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
80                  85                  90                  95

gac cgg ttt agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc acc ctg gaa atc     335
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile
                100                 105                 110

agt aga gtg aag gct gag gat gtg ggt gtg tat tac tgt caa caa ctt     383
Ser Arg Val Lys Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu
            115                 120                 125

gta gag tat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa     431
Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        130                 135                 140
```

(210) 3

(211) 16

(212) PRT

(213) *Mus musculus*

(400) 3

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

1 5 10 15

(210) 4

(211) 48

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (48)

(400) 4

cgc tcg agt aag agt ctc ctg tat aag gat ggg aag aca tac ttg aat 48

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

1 5 10 15

(210) 5

(211) 7

(212) PRT

(213) *Mus musculus*

(400) 5

Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser

1 5

(210) 6

(211) 21

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (21)

(400) 6

ttg atg tcc acc cgg gca tca 21

Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser

1 5

(210) 7

(211) 9

(212) PRT

(213) *Mus musculus*

(400) 7

Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

(210) 8

(211) 27

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (27)

(400) 8

caa cag ctg gta gag tat cca ttc acg 27

Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

(210) 9

(211) 5

(212) PRT

(213) *Mus musculus*

(400) 9

Gly Tyr Trp Met Ser

1 5

(210) 10

(211) 15

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (15)

(400) 10

ggc tac tgg atg tcc 15

Gly Tyr Trp Met Ser

1 5

(210) 11

(211) 19

(212) PRT

(213) *Mus musculus*

(400) 11

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

(210) 12

(211) 57

(212) DNS

(213) *Mus musculus*

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (57)

(400) 12

gaa att aga ttg aaa tct gat aat tat gca aca cat tat gcg gag tct 48
Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

gtg aag ggg 57
Val Lys Gly

(210) 13

(400) 13

000

(210) 14

(400) 14

000

(210) 15

(211) 19

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus szekvencia

(400) 15

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

(210) 16

(211) 19

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus szekvencia

(400) 16

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala

(210) 17

(211) 348

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: humanizált anti-CD23 antitest könnyűlánc variábilis régió

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (348)

(400) 17

```
gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga    48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgt cgc tcg agt aag agt ctc ctg tat aag    96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys
            20                  25                  30

gat ggg aag aca tac ttg aat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct   144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca cag ctc ctg atc tat ttg atg tcc acc cgg gca tca ggg gtc cct   192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc   240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgt caa cag ctg   288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu
                85                  90                  95

gta gag tat cca ttc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa   336
Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgt acg gtg gct                                                  348
Arg Thr Val Ala
        115
```

(210) 18

(211) 1335

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: humanizált anti-CD23 antitest nehézlánc variábilis régió

(220)

(221) CDS

(222) (1) ... (1335)

(400) 18

```
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag ccc ggg ggg   48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15

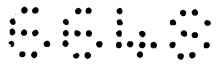
tcc ctt aga ctc tcc tgt gca gct agc gga ttc act ttc agt ggc tac   96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

tgg atg tcc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctc gag tgg gtt  144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gct gaa att aga ttg aaa tct gat aat tat gca aca cat tat gcg gag  192
Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

tct gtg aag ggg aaa ttc acc atc tca aga gat gat tca aaa tct aga  240
Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg
65                  70                  75                  80

ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac aca gcc gtg tat  288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
```



```
tac tgt aca gat ttc ata gac tgg ggc cag gga aca cta gtc acc gtc   336
Tyr Cys Thr Asp Phe Ile Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            100                 105                 110

tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc   384
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
        115                 120                 125

tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag   432
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    130                 135                 140

gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg   480
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145                 150                 155                 160

acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc   528
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
                165                 170                 175

tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc   576
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
            180                 185                 190

cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg   624
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

gac aag aaa gtg gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca   672
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

ccg tgc cca gca cct gaa ctc gcg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc   720
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
225                 230                 235                 240

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc   768
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                245                 250                 255

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc   816
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270
```



```
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg   864
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
        275                 280                 285

cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc   912
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
    290                 295                 300

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc   960
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305                 310                 315                 320

tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc   1008
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
                325                 330                 335

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg   1056
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
            340                 345                 350

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc   1104
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
        355                 360                 365

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg   1152
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
    370                 375                 380

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc   1200
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385                 390                 395                 400

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag   1248
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
                405                 410                 415
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac   1296
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
            420                 425                 430

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga               1335
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

(210) 19

(211) 25

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 19

gatgaagctt tacagttact cagcacacag gacctcacca tggattttgg gctgatt 57

(210) 20

(211) 25

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 20

gatggactag tgtcccttgg cccca 25

(210) 21

(211) 57

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 21

gatgaagctt tacagttact cagcacacag gacctcacca tgaggttctc tgttcag 57

(210) 22

(211) 28

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 22

gatgcgtacg tytkatytcc avcttkgt 28

(210) 23

(211) 30

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 23

gatcaagctt ctctacagtt actgagcaca 30

(210) 24

(211) 63

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 24

aatcaagtat gtcttcccat ccttatacag gagactctta ctcgagcgac

aggagatgga 60

ggc 63

(210) 25

(211) 63

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 25

cgctcgagta agagtctcct gtataaggat gggaagacat acttgaattg

gtacctgcag 60

aag 63

(210) 26

(211) 36

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 26

tgatgcccgg gtggacatca aatagatcag gagctg 36

(210) 27

(211) 36

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 27

ttgatgtcca cccgggcatc aggggtccct gacagg 36

(210) 28

(211) 84

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 28

agccacctga cgtttgatct ccaccttggt cccttggccg aacgtgaatg

gatactctac 60

cagctgttga cagtaataaa cccc 84

(210) 29

(211) 60

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 29

acacgaagct tcaccatggc ttgggtgtgg accttgctat tcctgatggc

ggccgcccaa 60

(210) 30

(211) 66

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 30

ctttaccaag cctcccccag actccaccag ctgcacctct gcttgggcac

tttgggcggc 60

cgccat 66

(210) 31

(211) 60

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 31

ttggtaaagc ccgggggggtc ccttagactc tcctgtgcag ctagcggatt cactttcagt 60

(210) 32

(211) 60

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 32

ccccttccct ggagcctggc ggacccagga catccagtag ccactgaaag tgaatccgct 60

(210) 33

(211) 60

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 33

gggaaggggc tcgagtgggt tgctgaaatt agattgaaat ctgataatta tgcaacacat 60

(210) 34

(211) 60

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 34

atcatctctt gagatggtga atttcccctt cacagactcc gcataatgtg ttgcataatt 60

(210) 35

(211) 66

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 35

atctcaagag atgattcaaa atctagactg tatctgcaaa tgaacagcct

gaaaaccgag 60

gacaca 66

(210) 36

(211) 69

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 36

ggtgactagt gttccctggc cccagtctat gaaatctgta cagtaataca

cggctgtgtc 60

ctcggtttt 69

(210) 37

(211) 48

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 37

gctgctcctt ttaagctttg gggtcaaggc tcactagtca cagtctcc 48

(210) 38

(211) 24

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 38

tgacggtgcc cccgcgagtt cagg 24

(210) 39

(211) 24

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 39

cctgaactcg cgggggcacc gtca 24

(210) 40

(211) 33

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: oligo

(400) 40

aagcttccgt cgaattcatt tacccggaga cag 33

(210) 41

(211) 37

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: láncindító

(400) 41

actagtcgac atgaagtttc cttctcaact tctgctc 37

(210) 42

(211) 8

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus szekvencia

(400) 42

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
1 5

(210) 43

(211) 8

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus szekvencia

(400) 43

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
1 5

(210) 44

(211) 8

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus szekvencia

(400) 44

Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg Thr
1 5

(210) 45

(211) 8

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus szekvencia

(400) 45

Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Thr
1 5

(210) 46

(211) 415

(212) DNS

(213) Mus musculus

(400) 46

(210) 47

(211) 437

(212) DNS

(213) Mus musculus

(400) 47

cgtacgtttt atttccaact ttgtccccga gccgaacgtg aatggatact ctacaagttg 60
ttgacagtaa tacacaccca catcctcagc cttcactcta ctgatttcca gggtgaaatc 120
tgtgcctgac ccactgccac taaaccggtc tgagactcct gatgcacggg tggacatcaa 180
atacatcagg agctgaggag attgtcctgg tctctgcaga aaccaattca agtatgtctt 240
cccatcctta tacaggagac tcttactaga cctgcaggag atggaaactg attctccaga 300
agtgacagga ttggagagtt catcctgggt tatcacaata tccccactga ctccagagat 360
ccagaacata agcaccccca gaaactgaac agagaacctc atggtgaggt cctgtgtgct 420
gagtaactgt aaagctt 437

(210) 48

(211) 348

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: humanizált anti-CD23 antitest könnyűlánc variábilis régió

(400) 48

agccaccgta cgtttgatct ccaccttggt cccttggccg aacgtgaatg gatactctac 60
cagctgttga cagtaataaa ccccaacatc ctcagcctcc actctgctga ttttcagtgt 120
aaaatctgtg cctgatccac tgccactgaa cctgtcaggg acccctgatg cccgggtgga 180
catcaaatag atcaggagct gtggagactg ccctggcttc tgcaggtacc aattcaagta 240
tgtcttccca tccttataca ggagactctt actcgagcga caggagatgg aggccggctc 300
tccaggggtg acgggcaggg agagtggaga ctgagtcatc acaatatc 348

(210) 49

(211) 1335

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: humanizált anti-CD23 antitest nehézlánc variábilis régió

(400) 49

tcatttaccc ggagacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gagcctcatg 60
catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtgagctt 120
gctgtagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct tgtagttgtt 180
ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240
caggcaggtc aggctgacct ggttcttggt cagctcatcc cgggatgggg gcagggtgta 300
cacctgtggt tctcggggct gcccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360
gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctccttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420
gacggtgagg acgctgacca cacggtacgt gctgttgtac tgctcctccc gcggctttgt 480
cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540
gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600
cttgggtttt gggggaaga ggaagactga cggtgccccc gcgagttcag gtgctgggca 660
cggtgggcat gtgtgagttt tgtcacaaga tttgggctcc actttcttgt ccaccttggt 720
gttgctgggc ttgtgattca cgttgcagat gtaggtctgg gtgcccaagc tgctggaggg 780
cacggtcacc acgctgctga gggagtagag tcctgaggac tgtaggacag ccgggaaggt 840
gtgcacgccg ctggtcaggg cgcctgagtt ccacgacacc gtcaccggtt cggggaagta 900
gtccttgacc aggcagccca gggccgctgt gcccccagag gtgctcttgg aggagggtgc 960
caggggaag accgatgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgacta gtgttccctg 1020
gccccagtct atgaaatctg tacagtaata cacggctgtg tcctcggttt tcaggctgtt 1080
catttgcaga tacagtctag attttgaatc atctcttgag atggtgaatt tccccttcac 1140
agactccgca taatgtgttg cataattatc agatttcaat ctaatttcag caacccactc 1200
gagccccttc cctggagcct ggcggaccca ggacatccag tagccactga aagtgaatcc 1260
gctagctgca caggagagtc taagggaccc cccgggcttt accaagcctc ccccagactc 1320
caccagctgc acctc 1335

(210) 50

(211) 137

(212) PRT

(213) Mus musculus

(400) 50

| Ala | Leu | Gln | Leu | Leu | Ser | Thr | Gln | Asp | Leu | Thr | Met | Asp | Phe | Gly | Leu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 |
| Ile | Phe | Phe | Ile | Val | Leu | Leu | Lys | Gly | Val | Gln | Ser | Glu | Val | Lys | Leu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Glu | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Met | Lys | Leu |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ser | Cys | Val | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Gly | Tyr | Trp | Met | Ser | Trp |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Val | Arg | Gln | Ser | Pro | Glu | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | Ala | Glu | Ile | Arg |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Leu | Lys | Ser | Asp | Asn | Tyr | Ala | Thr | His | Tyr | Ala | Glu | Ser | Val | Lys | Gly |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Lys | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | Ser | Arg | Leu | Tyr | Leu | Gln |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Ser | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Thr | Asp |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Phe | Ile | Asp | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | | | | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | | | | | |

(210) 51

(211) 145

(212) PRT

(213) Mus musculus

(400) 51

Ala Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Thr Met Arg Phe Ser Val
1 5 10 15

Gln Phe Leu Gly Val Leu Met Phe Trp Ile Ser Gly Val Ser Gly Asp
20 25 30

Ile Val Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Asn Pro Val Thr Ser Gly Glu
35 40 45

Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp
50 55 60

Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
65 70 75 80

Gln Leu Leu Met Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser Asp
85 90 95

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser
100 105 110

Arg Val Lys Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Val
115 120 125

Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
130 135 140

Thr
145

(210) 52

(211) 116

(212) PRT

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: humanizált anti-CD23 antitest könnyűlánc variábilis régió

(400) 52

**Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly**
**1 5 10 15**

**Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys**
**20 25 30**

**Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser**
**35 40 45**
**Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro**
**50 55 60**

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

**Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu**
**85 90 95**

**Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**
**100 105 110**

**Arg Thr Val Ala**
**115**

(210) 53

(211) 444

(212) DNS

(213) Mesterséges szekvencia

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: humanizált anti-CD23 antitest nehézlánc variábilis régió

(400) 53

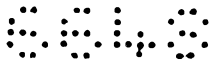
| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Gly | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Trp | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala | Glu | Ile | Arg | Leu | Lys | Ser | Asp | Asn | Tyr | Ala | Thr | His | Tyr | Ala | Glu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ser | Val | Lys | Gly | Lys | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | Ser | Arg |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | |



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

Tyr Cys Thr Asp Phe Ile Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

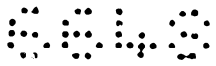
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285



Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antitest, amely az alábbi CDR-ek mindegyikének aminosav-szekvenciájából az antitestnek a hematopoietikus sejteken expresszálódott CD23 (FCεRII) II. típusú molekulához való kötődéséhez elegendő hosszúságú szakaszt tartalmaz:

| | |
|---|---|
| RSSKSLLY KDGKTYLN | CDRL1 (3. azonosítószámú szekvencia) |
| LMSTRAS | CDRL2 (5. azonosítószámú szekvencia) |
| QQLVEYPFT | CDRL3 (7. azonosítószámú szekvencia) |
| GYWMS | CDRH1 (9. azonosítószámú szekvencia) |
| EIRLKSDNYATHYAESVKG | CDRH2 (11. azonosítószámú szekvencia) |
| FID..... | CDRH3 (13. azonosítószámú szekvencia) |

2. Antitest, amely legalább Ka = $1*10^9$ $M^{-1}$ értékű affinitási állandóval kötődik hematopoietikus sejteken expresszálódott CD23 (FCεRII) II. típusú molekulához vagy oldható CD23-hoz.

3. Antitest, amely kompetitíve gátolja az 1. igénypontban felsorolt CDR-szekvenciákat tartalmazó antitest kötődését hematopoietikus sejteken expresszálódott CD23 (FCεRII) II. típusú molekulához.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely megváltoztatott antitest.

5. A 4. igénypont szerinti antitest, amely humanizált antitest.

6. Az 1-5. igénypont szerinti antitest, amelyben a nehézlánc vázszekvenciája a 49., 66., 76., 77. és 94. pozíciók bármelyikében egéreredetű aminosavakat tartalmaz.

7. Az 1-6. igénypont szerinti antitest, ahol a könnyűlánc vázszekvenciája a 64. pozícióban egéreredetű aminosavat tartalmaz.

8. Antitest, amely a szekvencialistában az 1. és 2. azonosítószámon megadott szekvenciák egyikét, vagy mindkettőt tartalmazza.

9. Antitest, amely a szekvencialistában 17 és 18. azonosítószámon megadott szekvenciák egyikét, vagy mindkettőt tartalmazza.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amelyben az állandó régió a *Kabat*-féle számozás szerint a 235. pozícióban Ala-t (alanint) és a 237-es pozícióban Ala-t (alanint) tartalmaz.

11. Az 1-10. igénypont szerinti antitest humán terápiában való alkalmazásra.

12. Az 1-10. igénypont szerinti antitest alkalmazása arthritis, lupus erythematosus, Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladás, sclerosis multiplex, cukorbetegség, uveagyulladás, bőrgyulladás, sömör, csalánkiütés, nephrosisos tünetegyüttes, glomerulonephritis, gyulladásos bélbetegség, fekélyes vastagbél-gyulladás, Crohn-féle betegség, Sjogren-féle szindróma, allergiák, allergiás asztma, valódi asztma, akut asztmatikus roham, az orrnyálkahártya gyulladása, ekcéma, GVH, COPD, insulitis, hörghurut (különösen a krónikus hörghurut), illetve cukorbetegség (előnyösen az 1 típusú

cukorbetegség), malignus B-sejt-elváltozások bármelyikének kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

13. Hematopoietikus sejteken expresszálódott CD23 (FCεRII) II. típusú molekulát kötő antitest alkalmazása oldható CD23 kialakulásának gátlására szolgáló gyógyszer előállításában.

14. Antitest 13. igénypont szerinti alkalmazása, amely antitest az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti antitest.

15. Antitest-láncot kódoló DNS-szekvencia, amely a következő szekvenciák közül egyet vagy többet tartalmaz:

| | |
|---|---|
| CDRL1, | a 3. ábra szerinti 70-117-es számú bázispárok ; (4. azonosítószámú szekvencia) |
| CDRL2, | a 3. ábra szerinti 163-183-as számú bázispárok ; (6. azonosítószámú szekvencia) |
| CDRL3, | a 3. ábra szerinti 280-306-os számú bázispárok ; (8. azonosítószámú szekvencia) |
| CDRH1, | a 4. ábra szerinti 91-105-ös számú bázispárok ; (10. azonosítószámú szekvencia) |
| CDRH2, | a 4. ábra szerinti 148-204-es számú bázispárok ; (12. azonosítószámú szekvencia) |
| CDRH3, | a 4. ábra szerinti 301-309-es számú bázispárok ; (14. azonosítószámú szekvencia) |

16. Antitestláncot kódoló DNS-szekvencia, amely a szekvencialistában 1. és 2. azonosítószámon megadott szekvenciákat kódoló szekvenciák egyikét vagy mindkettőt tartalmazza.

17. Antitestláncot kódoló DNS-szekvencia, amely a szekvencialistában 17 és 18. azonosítószámon megadott szekvenciák egyikét vagy mindkettőt tartalmazza.

18. Gyógyászati készítmény, amely az 1-10. igénypont szerinti antitestet és gyógyászatilag elfogadható segédanyagot tartalmaz.

19. Gyógyászati készítmény, amely immunmoduláns vagy gyulladásgátló hatóanyaggal kombinálva az 1-10. igénypont szerint meghatározott antitestet és gyógyászatilag elfogadható segédanyagot tartalmaz.

97 oldal leírás
6 oldal rajz
103 oldal

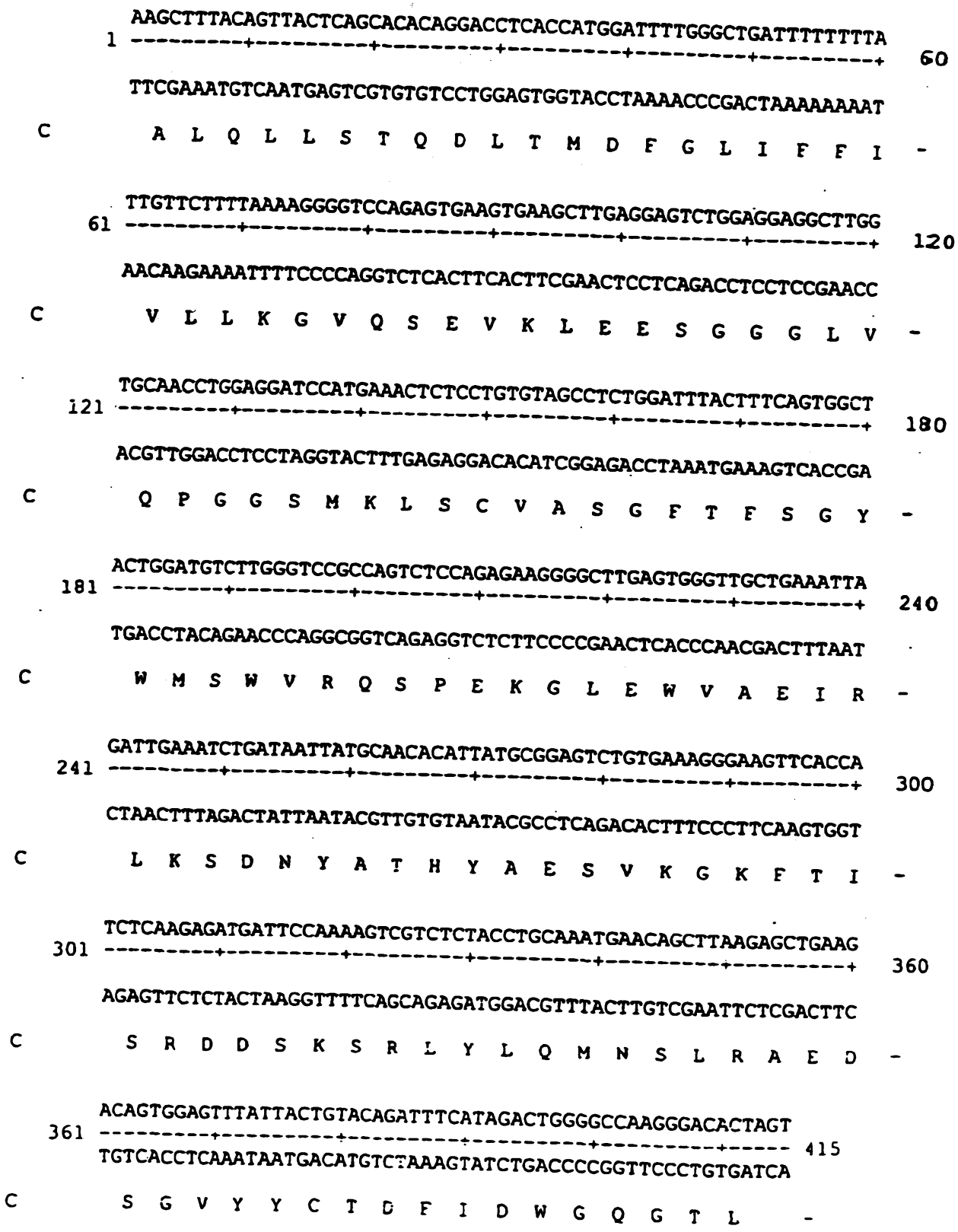
A meghatalmazott:
Danubia
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Svingor Ádám

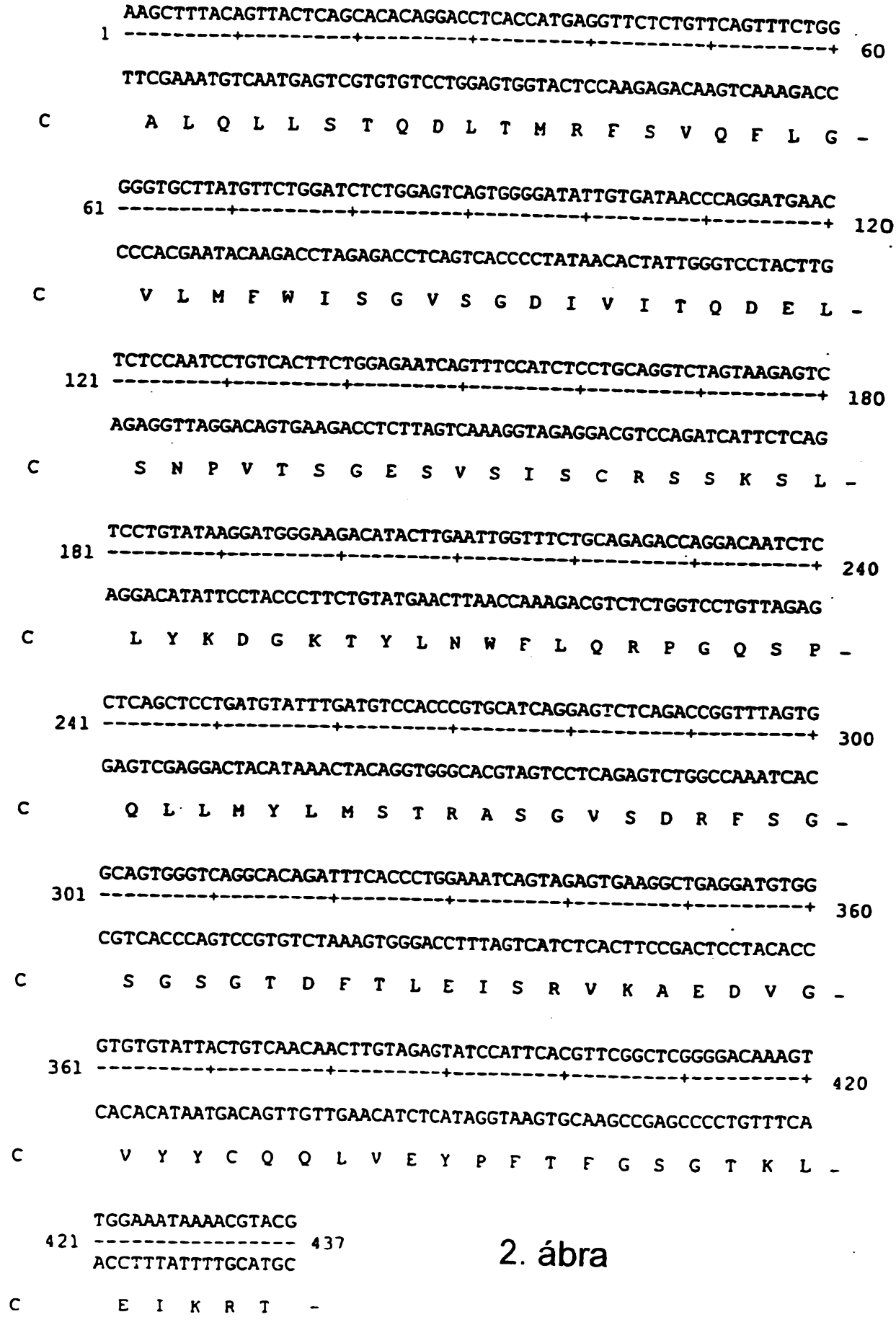
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

P0102005

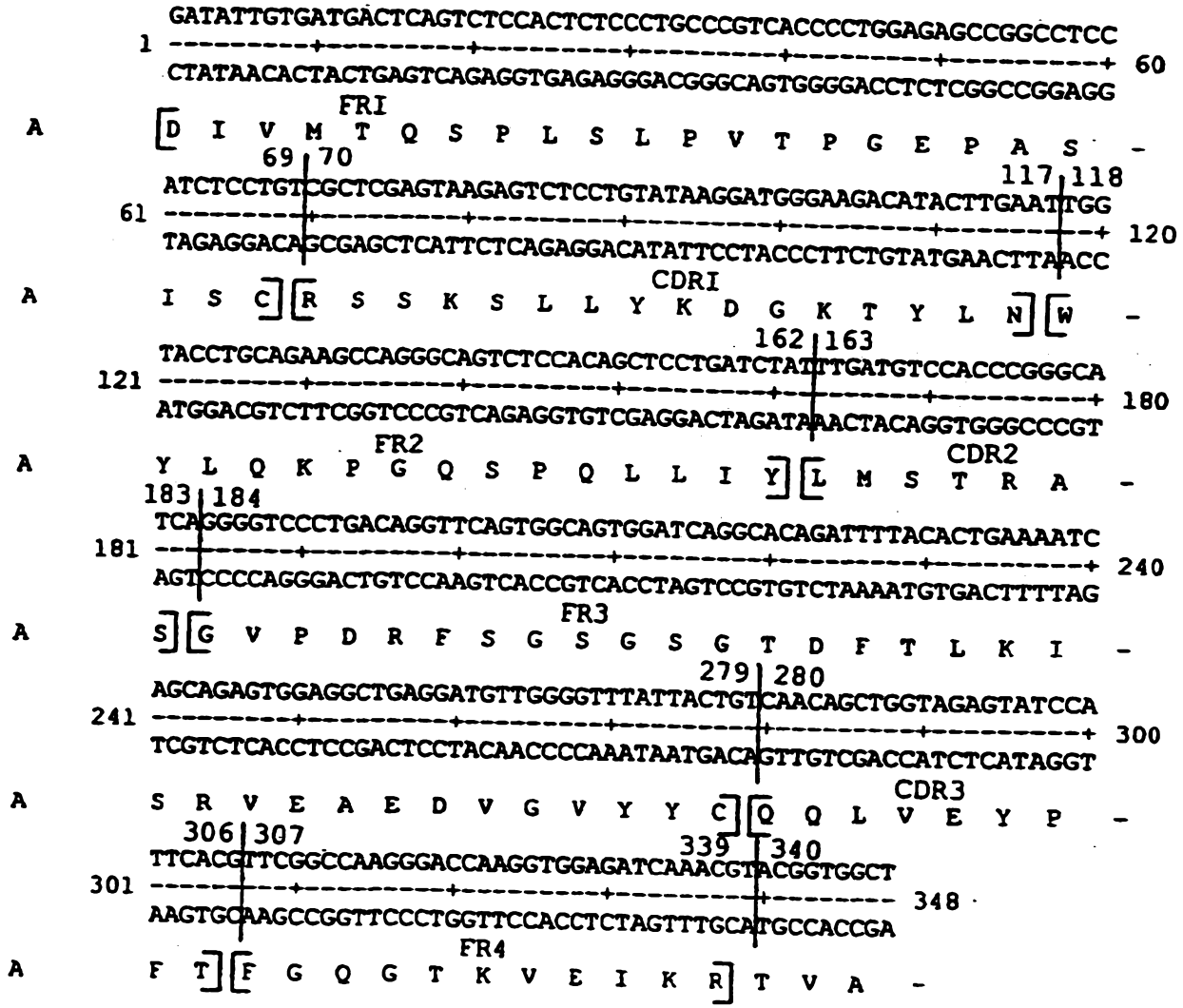
A2




1. ábra

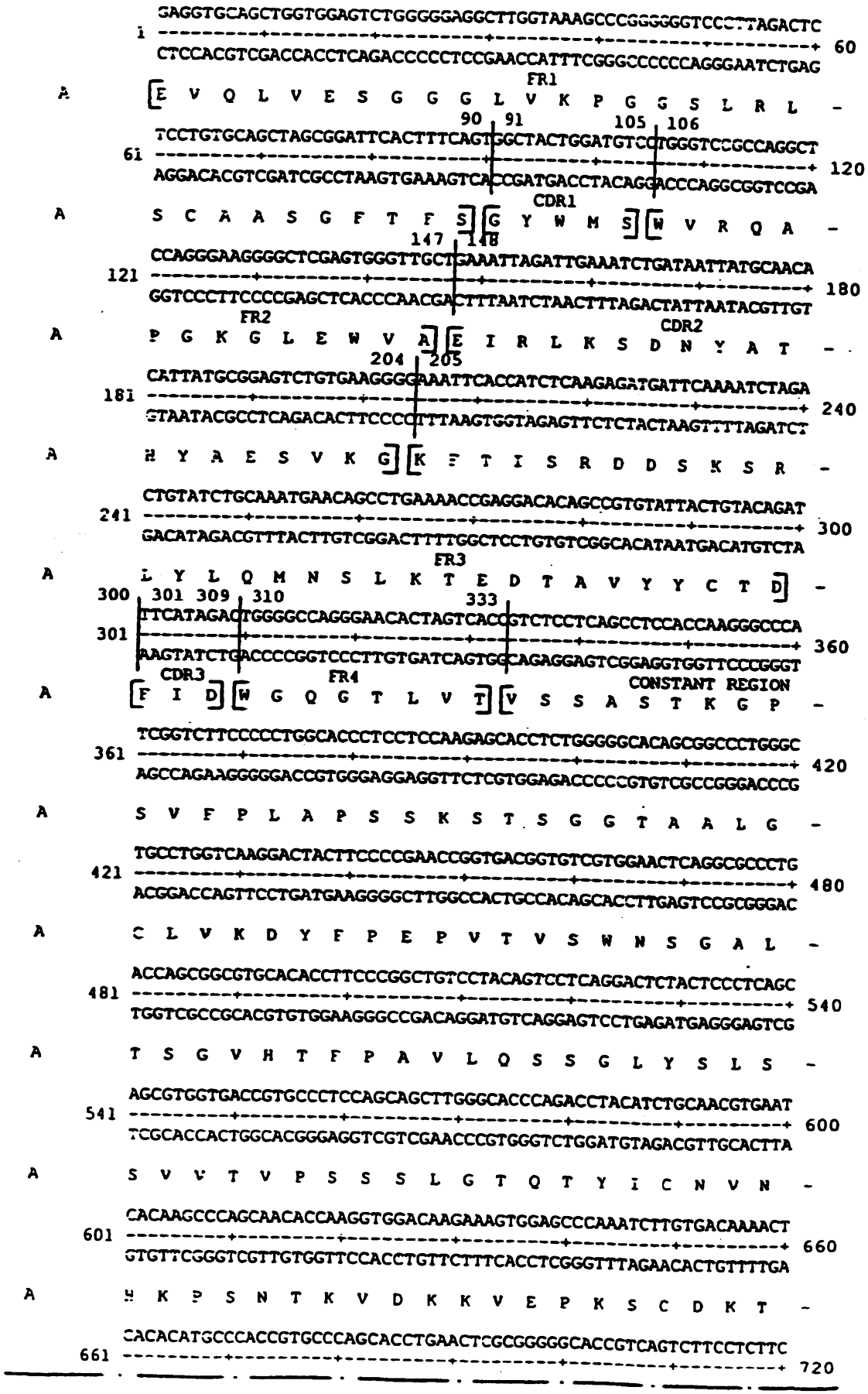

AAGCTTTACAGTTACTCAGCACACAGGACCTCACCATGAGGTTCTCTGTTCAGTTTCTGG
1
60
TTCGAAATGTCAATGAGTCGTGTGTCCTGGAGTGGTACTCCAAGAGACAAGTCAAAGACC
C A L Q L L S T Q D L T M R F S V Q F L G -
GGGTGCTTATGTTCTGGATCTCTGGAGTCAGTGGGGATATTGTGATAACCCAGGATGAAC
61
120
CCCACGAATACAAGACCTAGAGACCTCAGTCACCCCTATAACACTATTGGGTCCTACTTG
C V L M F W I S G V S G D I V I T Q D E L -
TCTCCAATCCTGTCACTTCTGGAGAATCAGTTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTC
121
180
AGAGGTTAGGACAGTGAAGACCTCTTAGTCAAAGGTAGAGGACGTCCAGATCATTCTCAG
C S N P V T S G E S V S I S C R S S K S L -
TCCTGTATAAGGATGGGAAGACATACTTGAATTGGTTTCTGCAGAGACCAGGACAATCTC
181
240
AGGACATATTCCTACCCTTCTGTATGAACTTAACCAAAGACGTCTCTGGTCCTGTTAGAG
C L Y K D G K T Y L N W F L Q R P G Q S P -
CTCAGCTCCTGATGTATTTGATGTCCACCCGTGCATCAGGAGTCTCAGACCGGTTTAGTG
241
300
GAGTCGAGGACTACATAAACTACAGGTGGGCACGTAGTCCTCAGAGTCTGGCCAAATCAC
C Q L L M Y L M S T R A S G V S D R F S G -
GCAGTGGGTCAGGCACAGATTTCACCCTGGAAATCAGTAGAGTGAAGGCTGAGGATGTGG
301
360
CGTCACCCAGTCCGTGTCTAAAGTGGGACCTTTAGTCATCTCACTTCCGACTCCTACACC
C S G S G T D F T L E I S R V K A E D V G -
GTGTGTATTACTGTCAACAACTTGTAGAGTATCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGT
361
420
CACACATAATGACAGTTGTTGAACATCTCATAGGTAAGTGCAAGCCGAGCCCCTGTTTCA
C V Y Y C Q Q L V E Y P F T F G S G T K L -
TGGAAATAAAACGTACG
421
437
ACCTTTATTTTGCATGC
C E I K R T -

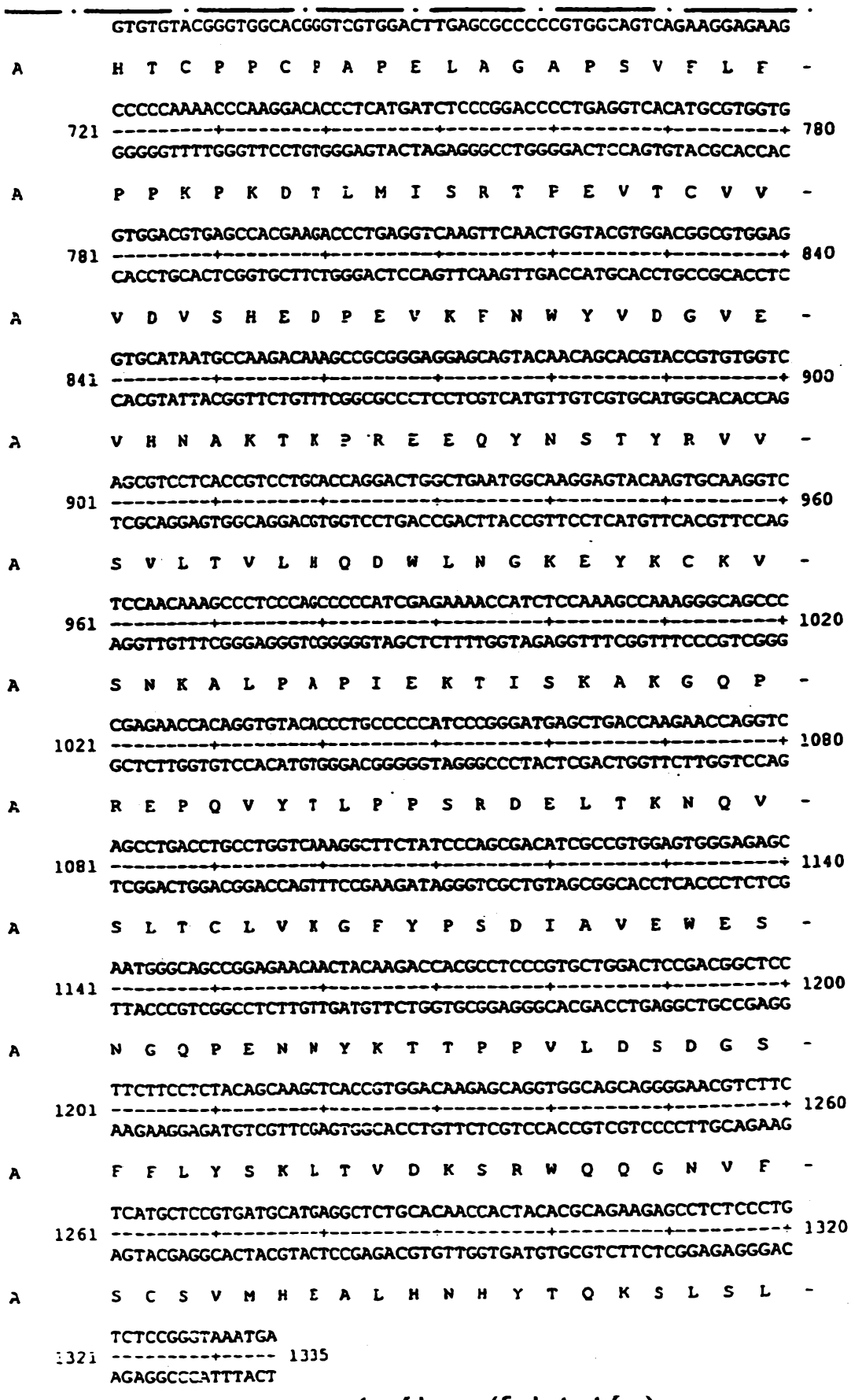
2. ábra


GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
1
CTATAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGGGGACCTCTCGGCCGGAGG
60
FRI
A
D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S -
69 70
117 118
ATCTCCTGTCGCTCGAGTAAGAGTCTCCTGTATAAGGATGGGAAGACATACTTGAATTGG
61
TAGAGGACAGCGAGCTCATTCTCAGAGGACATATTCCTACCCTTCTGTATGAACTTAACC
120
CDRI
A
I S C R S S K S L L Y K D G K T Y L N W -
162 163
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGATGTCCACCCGGGCA
121
ATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATAAACTACAGGTGGGCCCGT
180
FR2
CDR2
A
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L M S T R A -
183 184
TCAGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
181
AGTCCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGTCTAAAATGTGACTTTTAG
240
FR3
A
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I -
279 280
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGTCAACAGCTGGTAGAGTATCCA
241
TCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACAGTTGTCGACCATCTCATAGGT
300
CDR3
A
S R V E A E D V G V Y Y C Q Q L V E Y P -
306 307
339 340
TTCACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT
301
AAGTGCAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTCTAGTTTGCATGCCACCGA
348
FR4
A
F T F G Q G T K V E I K R T V A -

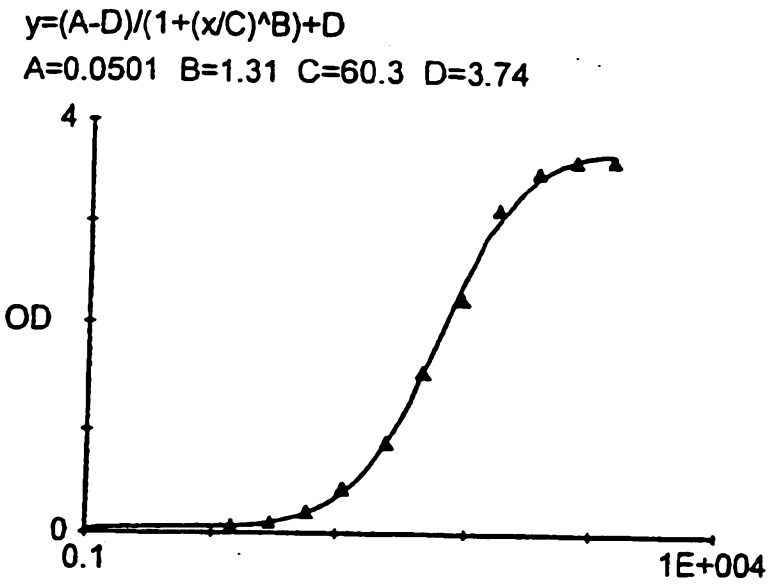
3. ábra

# 4. ábra






4. ábra (folytatás)

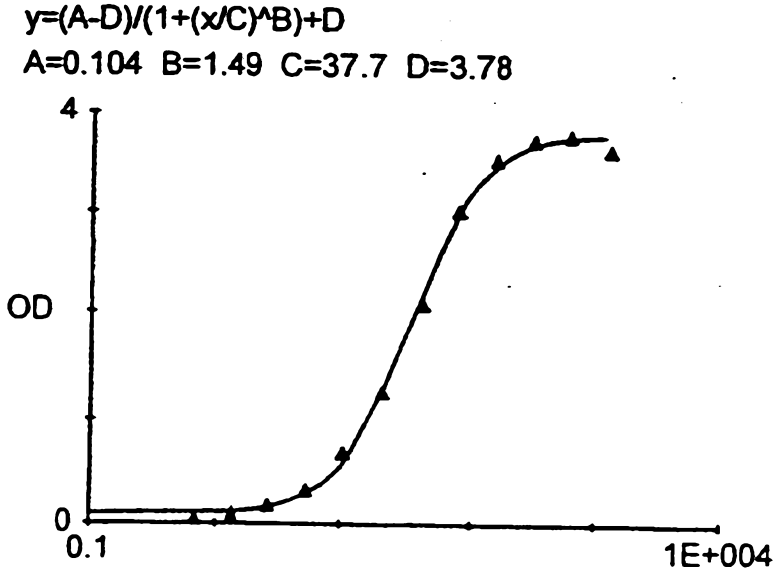



NG/ML LOGARITMIKUS BEOSZTÁSA

KIMERIKUS CD23 IGG1M

FÉL-MAXIMÁLIS KÖTÉS = 16,28 NG/ML

5. ábra




NG/ML LOGARITMIKUS BEOSZTÁSA

HUMANIZÁLT CD23 IGG1M

FÉL-MAXIMÁLIS KÖTÉS = 16,28 NG/ML

6. ábra