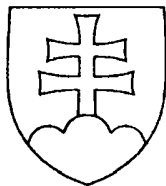


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

(22) 26.01.94
(31) 07/856 281, 07/735 064
(32) 23.03.92, 25.07.91
(33) US, US
(43) 07.09.94
(86) PCT/US92/06194, 24.07.92

(21)

88-94

(13) A3

(51)

**C 07 K 15/28,
C 07 H 15/00,
C 12 P 21/08,
C 12 N 5/26, 15/02**

(71) IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, San Diego, CA, US;

(72) NEWMAN Roland A., San Diego, CA, US;
HANNA Nabil, Olivenhain, CA, US;
RAAB Ronald W., San Diego, CA, US;

(54) **Rekombinantné protilátky na humánnu terapiu**

(57) Riešenie predstavuje postup ako obísť problém hostiteľskej odpovede na terapeutickú protilátku tvorbou viacerých protilátok potrebnej špecificity a žiadanej efektorovej funkcie a spoločné využitie ich štruktúr pri vytváraní rekombinantných protilátok. Tieto rekombinantné protilátky typicky obsahujú úsek variabilnej oblasti protilátky, odvodený z imunizovanej opice a konštantnú oblasť ľudskej protilátky. Takto sa zachovávajú špecificity a vysoké afinity monoklonálnych protilátok aj vyžadované efektorové funkcie spojené s rôznymi ľudskými konštantnými oblasťami. Používané spôsoby zväčša zahŕňujú vyvolanie opičích protilátok k ľudským antigénom a izolácie opičích nukleových kyselín, kódujúcich antigén-rozpoznávajúce úseky variabilných oblastí, ktorých základná štruktúra je prekvapivo homolóna s ľudskou, a nasledujúcu ligáciu k ľudskej nukleovej kyseline, kódujúcej ľudskú konštantnú oblasť, ktorá je zvyčajne vopred obsiahnutá v kazetovom vektore exprese. Na expresiu sa s výhodou používajú imortalizované opičie B-bunky.

Rekombinantné protilátky na humánnu terapiu

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka rekombinantných protilátok užitočných pre humánnu terapiu a metód na produkciu takýchto protilátok. Táto prihláška je časť pokračovania v U.S. patentovej prihláške Newman et al, ser. č. 07/856 281, podanej 23. marca 1992, ktorá je časťou pokračovania v U.S. patentovej prihláške ser. č. 07/735 064, podanej 25. júla 1991, ktoré sú v celku vrátane obrázkov, tu obidve zahrnuté odkazom.

Súčasný stav techniky

Myšacie monoklonálne protilátky sa používajú v diagnostike ľudských chorôb a v riešení základných problémov biologického výzkumu. Tieto činidlá sú tiež užitočné v klinických skúškach ako terapeutiká na akútne a chronické ľudské choroby, vrátane leukémií, lymfómov, solidných tumorov (napr. črevného, mamárneho lebo pečeneového), AIDS a autoimúnnych chorôb.

Myšacie/ľudské chimérne protilátky boli vytvorené a ukázalo sa, že vykazujú väzobné charakteristiky rodičovskej myšacej protilátky a efektorové funkcie spojené s ľudskou konštantnou oblasťou. Pozri napr. Cabilly et al., U.S. Patent 4 816 567; Shoemaker et al., U.S. Patent 4 978 745; Beavers et al., U.S. Patent 4 975 369; a Boss et al., U.S. Patent 4 816 397, ktoré sú tu všetky zahrnuté odkazom. Obecne sa tieto chimérne protilátky konštruujú prípravou génovej knižnice z DNA extrahovanej z existujúcich myšacích hybridómov. Nishimura et al., 47 Cancer Research 999, 1987. V knižnici sa potom vyhľadávajú [screened] gény variabilných oblastí ťažkých a ľahkých reťazcov vykazujúce správny typ preskupenia protilátkového fragmentu. Klónované gény variabilných oblastí sú potom ligované do vektoru expresie obsahujúceho klónované kazety

[cassettes] vhodných génov ľudskej konštantnej oblasti ťažkého a ľahkého reťazca. Chimérne gény sú potom exprimované vo vybranej bunecnej línii, zvyčajne murínnej myelómovej.

Takéto chimérne protilátky boli použité v humánnej terapii. Protilátky k týmto chimérnym protilátkam však boli v rade prípadov vytvárané v ľudskom recipientovi. Takéto protilátky proti chimérnej protilátke znemožňujú pokračovanie terapie chimérnymi protilátkami.

Erlich et al., 34 Clinical Chemistry 1681, 1988, Erlich et al., 7 Hybridoma 385, 1988, Erlich et al., 6 Hybridoma 151, 1987, Erlich et al., 1 Human Antibody Hybridomas 23, 1990 (neuznávané ako predchádzajúci spôsob k tejto prihláške) tvrdia, že ľudské monoklonálne protilátky sú očakávaným zlepšením k myšacím monoklonálnym protilátkam v *in vivo* humánnej terapii. Postulujú tiež, že protilátky primátov, iné ako ľudské, napr. šimpanzie monoklonálne protilátky budú tolerované v ľuďoch pretože sú štruktúrne podobné ľudským protilátkam. Pretože ľudské protilátky sú neimunogénne v opiciach r. Rhesus (t.j. nevyvolávajú protilátkovú odpoveď), predpovedajú že protilátky primátov budú neimunogénne v ľuďoch. Naznačujú, že testovanie protilátok v ľuďoch nebude potrebné ak protilátka primáta má štruktúru konštantnej oblasti rovnakú ako ľudská alebo, prinajmenšom, ak štruktúra nie je odlišná viac, ako sú ľudské protilátky odlišné medzi sebou navzájom. Teda : *tvrdia*, že šimpanzie protilátky by mali byť užitočné v ľudskej terapii.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález sa týka spôsobov amplifikácie a klónovania génov opíc Starého sveta (na ktoré sa tu odkazuje ako na "opice", napr. baboon lebo makak), kódujúcich aintigén-viažuce časti variabilných oblastí imunoglobulínov, fúzovania týchto génov ku klónovaným ľudským, šimpanzím lebo iným opičím génom, kódujúcim konštantné oblasti (a ľudským, šimpanzím

lebo iným opičím génom, kódujúcim základnú štruktúru [framework], ak je to potrebné), a spôsobov ich exprese ako ľudských/opičích rekombinantných protilátok lebo plne opičích rekombinantných protilátok. Navyše, vynález sa týka použitia takýchto rekombinantných protilátok (kde tento výraz zahrnuje protilátky produkované fúziou DNA z dvoch rôznych génov pre protilátky, dokonca aj z toho istého druhu, napr. dvoch rôznych génov pre opičie protilátky, napríklad opíc r. Rhesus a cynomolgus, za vzniku opičej/opičej rekombinantnej protilátky) ako imunoterapeutického činidla na liečbu ľudských chorôb. Vynález je založený na objave, že vývojovo vzdialené opice (napr. baboon lebo makak (vrátane opíc cynomologus a r. Rhesus)), na rozdiel od šimpanza, sú nielen dostatočne rozdielne od ľudí na to, aby sa v nich dali vytvoriť protilátky proti ľudským antigénom, dokonca k relatívne konzervovaným ľudským antigénom, napr. CD4 a CD54, ale sú aj dostatočne podobné ľuďom na to, aby mali protilátky podobné ľudským protilátkam tak, že nedôjde k žiadnej hostiteľskej imunitnej odpovedi keď sa takéto opičie protilátky, lebo z nich odvodené rekombinantné protilátky, zavedú do človeka.

Na rozdiel od protilátok skôr používaných na humánnu terapiu, protilátky podľa predkladaného vynálezu netrpia niektorými nedostatkami, napr. 1) imunogenitou a vyvolávaním ľudskej anti-protilátkovej (human anti-antibody, HAA) odpovede pri opakovanom podávaní potrebnom na liečbu chronických chorôb, 2) relatívne krátkym pol časom života v porovnaní s ľudskými protilátkami a 3) chýbajúcimi efektorovými funkciami k ľudským bunkám alebo komplementu. Neprítomnosť týchto nedostatkov predstavuje podstatný pokrok pre humánnu terapiu protilátkami vytvorenými podľa tohoto vynálezu. Napríklad v prípade chronických ľudských chorôb, vrátane autoimúnnych, alebo akýchkoľvek chorôb, kde je potrebné dlhšie podávanie protilátky, jednou z hlavných prekážok opakovanej protilátkovej terapie je hostiteľská odpoveď na terapeutickú protilátku. HAA odpovede sú

často nepredvídateľné od pacienta k pacientovi. Takéto odpovede sú hlavne, aj keď nie výlučne, smerované proti konštantnej oblasti molekuly protilátky a akonáhle nastanú, často bránia ďalšej terapii danou protilátkou lebo inou protilátkou rovnakého izotypu, lebo zoslabujú účinnosť terapie.

Problémy HAA by sa potenciálne dali obísť použitím ľudských monoklonálnych protilátok. Tento prístup trpí ale etickými, klinickými a imunologickými obmedzeniami imunizácie ľudských subjektov mnohými antigénmi vybranými na tvorbu protilátok (napr. ľudskými antigénmi, kde tento výraz zahrnuje antigénne alebo imunogénne úseky ľubovoľnej bielkoviny, polypeptidu lebo ich ekvivalentu, nachádzajúcich sa v ľuďoch). Žiadateľov prístup ako obísť tento problém, zahrnuje tvorbu protilátok potrebnej špecifity a žiadanej efektorovej funkcie a ich použitie na produkciu rekombinantných protilátok. Tieto rekombinantné protilátky obecné obsahujú príslušný úsek variabilnej oblasti protilátky odvodennej z imunizovanej opice a konštantnú oblasť protilátky z človeka alebo šimpanza. Takto sa zachovávajú špecifity a vysoké afinity monoklonálnych protilátok, a potrebné ľudské lebo šimpanzie konštantné oblasti vykazujúce žiadané efektorové funkcie sa dajú ľahko vybrať.

Predkladaný vynález je ďalej založený na spôsobe amplifikácie opičích imunoglobulínových génov, napr. pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction, PCR), z RNA extrahovanej z opičích lymfocytov s použitím syntetických oligonukleotidových primerov špecifických pre rodinu génov variabilných oblastí ťažkých a ľahkých reťazcov. Amplifikované gény lebo príslušné oblasti (napríklad oblasti, ktoré kódujú oblasti určujúce komplementaritu [complementarity defining regions], CDR, viď Winter, britská patentová prihláška č. GB2188638A, takto tu zahrnutá odkazom) sú klónované do vektoru expresie obsahujúceho ľudské lebo šimpanzie gény konštantnej oblasti na produkciu opičej/ľudskej rekombinantnej protilátky

alebo vektoru obsahujúceho opičí gén konštantnej oblasti na produkciu plne opičej rekombinantnej protilátky žiadaného izotypu. Tieto protilátky predstavujú imunoterapeutické činidlá schopné lokalizovať alebo zabíjať príslušné cieľové bunky (napr. nádorové bunky) po *in vivo* podaní.

Takto je prvým aspektom vynálezu spôsob klónovania antigén-rozpoznávajúceho úseku variabilnej oblasti opičieho génu pre protilátku. Tento spôsob zahŕňa získanie nukleovej kyseliny, napr. RNA, z opice, tvorbu cDNA k RNA (s použitím reverznej transkriptázy), získanie primerov komplementárnych k sekvencii kódujúcej 5' vedúcu [leader] sekvenciu génu pre protilátku, spojenie tejto cDNA a primeru na vytvorenie hybridného komplexu a amplifikáciu cDNA za tvorby nukleovej kyseliny kódujúcej variabilnú oblasť opičieho génu pre protilátku.

Pod "antigén-rozpoznávacím úsekom" sa myslí jeden alebo viac úsekov variabilnej oblasti opičej protilátky, ktoré sú zodpovedné za väzbu protilátky alebo za rozpoznanie cieľového antigénu (lebo epitopu lebo idiotypu) protilátkou. Toto napríklad zahŕňa CDR oblasti (viď nižšie) alebo celé variabilné oblasti, alebo akúkoľvek kombináciu týchto dvoch oblastí vrátane akýchkoľvek zmien v kódujúcich oblastiach, ktoré môžu byť vyvolané na to, aby sa oblasti stali skôr "ľudskými" ako "opičími" bez zmeny špecifických väzobných vlastností protilátky. Ak sa použije len časť celej variabilnej oblasti, potom zostávajúce časti, napr. takzvaná "základná štruktúra" ["framework"], sú poskytnuté inou protilátkou, s výhodou ľudskou alebo šimpanzou protilátkou (viď nižšie) spôsobmi, na ktoré sa odkazuje vyššie a ktoré sú tu zahrnuté odkazmi.

Výrazy "variabilná oblasť", "vedúca [leader] sekvencia", "konštantná oblasť" a "základná štruktúra [framework]" sú tu používané spôsobom bežne uznávaným v obore a príklady sú poskytnuté v spôsoboch citovaných vyššie a zahrnutých tu odkazmi.

V prevedeniach ktorým sa dáva prednosť je vedúca sekvencia ľudská, šimpanzia lebo opičia vedúca sekvencia s približne 60 bázami, ktorej príklady sú uvedené v OBR. 1.

Žiadateľ objavil, že vedúce sekvencie opičích, šimpanzích a ľudských variabilných oblastí sú dostatočne podobné, aby primery konštruované pre jednu boli použiteľné pre amplifikáciu inej. Týmto spôsobom je RNA dostatočne amplifikovaná na tvorbu dostatku nukleovej kyseliny pre umiestnenie tejto nukleovej kyseliny do vektoru na ďalšie klónovanie.

Druhým aspektom vynálezu je spôsob produkcie protilátky k ľudskému antigénu, ktorý nie je imunogénny v ľuďoch. Tento spôsob zahŕňa vyvolanie [raising] opičej protilátky k ľudskému antigénu v opici a izoláciu opičej nukleovej kyseliny kódujúcej antigén-rozpoznávajúci úsek variabilnej oblasti opičej protilátky. Ľudská nukleová kyselina kódujúca ľudskú konštantnú oblasť protilátky sa získa a liguje k opičej nukleovej kyseline za tvorby rekombinantnej nukleovej kyseliny. Táto rekombinantná nukleová kyselina sa potom exprimuje na produkciu žiadanej protilátky. Alternatívne sa na tvorbu rekombinantnej protilátky dajú použiť nukleové kyseliny kódujúce šimpanzie lebo opičie konštantné oblasti. Aminokyselinové sekvencie ľudských a šimpanzích konštantných oblastí sa líšia málo, ak vôbec, (t.j. sú homológne) a tie rozdiely, ktoré existujú medzi opičiami a ľudskými sekvenciami sa dajú ľahko zmeniť štandardnými technikami ak sa na tvorbu rekombinantnej protilátky používa nukleová kyselina kódujúca opičiu konštantnú oblasť. Jediné, čo je kľúčové vo vynáleze je, aby vytváraná protilátka bola menej imunogénna ako opičia konštantná oblasť tak, že nevzniká žiadna významná imunitná odpoveď, keď sa protilátka zavádza do človeka. (Na takéto oblasti protilátky sa tu odkazuje ako na homológne oblasti). Takto je rekombinantná protilátka konštruovaná tak, aby bola čo do aminokyselinovej sekvencie funkčne taká istá ako ľudská protilátka, t.j. mala konštantnú oblasť homológnu

s ľudskou lebo šimpanzou konštantnou oblasťou. V súhrne, protilátka je natoľko ľudská nakoľko je potrebné znížiť možnosť nežiaducej imunitnej odpovede k protilátke a obsahuje antigén-viažuci úsek opičej protilátky.

Pod pojmom "neimunogéna" sa myslí, že protilátka vo väčšine ľudí nevyvoláva protilátkovú odpoveď sily postačujúcej na zníženie účinnosti pokračujúceho podávania protilátky počas obdobia postačujúceho na dosiahnutie dostatočného terapeutického účinku, napr. v porovnaní s myšacou alebo myšacou/ľudskou chimérnou protilátkou. S výhodou sa nepozoruje žiadna protilátková odpoveď.

Vo výhodných prevedeniach spôsob zahrňuje imortalizáciu opičej bunky zodpovednej za produkciu opičej protilátky napríklad hybridómovou fúziou, transformáciou *Herpes papio*, klónovaním jednotlivých B-buniek (nazývaným tiež "tranzientná imortalizácia") a vytvorením knižnice rekombinantných imunoglobulínov. V iných výhodných prevedeniach spôsob zahrňuje selekciu B-bunky z opice, či už z leukocytov periférálnej krvi, sleziny, kostnej drene lebo lymfatickej uzliny; selekciu klónu, ktorý produkuje vhodnú protilátku; získanie [rescuing] imunoglobulínového génu kódujúceho túto protilátku z imortalizovanej bunecnej línie a re-expressiu génov v produkčnej línii (t.j. v línii, ktorá spôsobuje produkciu protilátky dostatočnú na to, aby bola užitočná pre humánnu terapiu).

Tretím aspektom vynálezu je rekombinantná protilátka tvorená buď z ľudskej lebo šimpanzej konštantnej oblasti a antigén-rozpoznávajúceho úseku opičej variabilnej oblasti lebo z konštantnej oblasti prvej opice a antigén-rozpoznávajúceho úseku variabilnej oblasti druhej, rozdielnej opice.

Podobným aspektom vynálezu je monoklonálna protilátka, lebo Fab, (Fab)₂, dimér ľahkého reťazca lebo ťažkého reťazca, lebo akýkoľvek minimálny rekombinantný fragment z nich, ako sú Fv lebo jednoretazcová protilátka (single chain antibody, SCA) lebo iné

ích imunologicky aktívne fragmenty (napr. CDR oblasť) k ľudskému antigénu, vytvárané imortalizovanými opičiami B-bunkami. Takéto fragmenty sú užitočné ako imunosupresívne čididlá. Alternatívne protilátka podľa vynálezu môže mať kovalentne pripojenú [attached] efektorovú lebo reportérovú molekulu. Napríklad protilátka podľa vynálezu môže mať makrocyclus na chelatovanie atómu ťažkého kovu, lebo toxín, ako je ricín, pripojené kovalentnou mostíkovou štruktúrou. Navyše: Fc fragment lebo CH3 doména v kompletnej molekule protilátky môžu byť nahradené molekulou enzýmu lebo toxínu a časť imunoglobulínového reťazca môže byť previazaná s polypeptidovou efektorovou lebo reportérovou molekulou. Bišpecifické protilátky sa tiež môžu konštruovať pomocou štandardných postupov.

Ďalším aspektom vynálezu sú farmaceutické prostriedky, v ktorých protilátky podľa vynálezu sú poskytované na terapeutické lebo profylaktické použitie. Takéto protilátky môžu byť tiež poskytnuté ako imunotoxíny, t.j. molekuly, ktoré sú charakterizované dvomi zložkami a sú osobitne užitočné na zabíjanie vybraných buniek *in vitro* a *in vivo*. Jedna zložka je cytotoxické činidlo, ktoré je zvyčajne fatálne pre bunku, ak je k nej pripojené lebo absorbované. Druhá zložka, známa ako "dodávací vehikel", dáva prostriedok na prenos toxického činidla ku konkrétnemu typu buniek, ako sú nádorové bunky. Tieto dve zložky sú bežne prepojené chemickou väzbou lebo radom dobre známych chemických a genetických postupov. Ak je napríklad cytotoxické činidlo bielkovina a druhá zložka je intaktný imunoglobulín, spojenie sa dá dosiahnuť heterobifunkčnými činidlami [crosslinkers], napr. karbodiimidom, glutraldehydom a podobne. Vytváranie rôznych imunotoxínov je v obore dobre známe.

V inom podobnom aspekte vynález obsahuje nukleovú kyselinu kódujúcu ľudskú/opičiu rekombinantnú protilátku. Vo výhodných prevedeniach nukleová kyselina kóduje ľudskú lebo opičiu konštantnú oblasť a antigén-rozpoznávajúci úsek opičej

variabilnej oblasti a táto nukleová kyselina je purifikovaná, t.j. oddelená od biologických zložiek, s ktorými sa prirodzene vyskytuje alebo, ešte výhodnejšie, je poskytovaná ako homogénny roztok.

V ešte ďalšom aspekte vynález obsahuje CDR-rúbovanú [CDR-grafted] protilátku tvorenú prinajmenšom jednou z komplementaritu určujúcich oblastí (CDR), to je aminokyselinových zvyškov (s použitím štandardného Kabatovho systému označovania) 31 - 35 (CDR 1), 50 - 65 (CDR 2), a 95 - 102 (CDR 3) určitej variabilnej oblasti ľahkého reťazca opice Starého sveta a aminokyselinových zvyškov 24 - 34 (CDR 1), 50 - 56 (CDR 2), a 89 - 97 (CDR 3) určitej variabilnej oblasti ťažkého reťazca opice Starého sveta a základnú štruktúru imunoglobulínovej variabilnej oblasti z iného druhu. CDR-rúbovaná protilátka je schopná viazať ten istý antigén ako pôvodná opičia protilátka. Konštantná oblasť protilátky je odvodená z ľudského lebo šimpanzieho imunoglobulínu. Metodológia pre tento aspekt je obecné popísaná Jonesom et al., 321 Nature 522, 1986. Takéto rúbovanie môže obmeňovať CDR podľa potreby, aby sa zaistilo, že sa budú javiť podobnejšie ľudským a zmenšila sa pravdepodobnosť vyprovokovania škodlivej reakcie proti protilátke.

Vo výhodných prevedeniach spôsob zahrnuje imortalizáciu alebo selekciu bunky z makaka, ktorá je zodpovedná za produkciu makakovej protilátky a získanie imunoglobulínových génov z tejto bunky; klónovanie a sekvenovanie protilátkových génov zodpovedajúcich za produkciu protilátky; výber ľudskej sekvencie základnej štruktúry variabilnej oblasti (prednostne s najtesnejšou homológiou k základnej štruktúre makakovej variabilnej oblasti); a náhradu ľudských CDR sekvencií makakovými CDR sekvenciami, menšie modifikácie v ľudskej oblasti základnej štruktúry môžu byť zahrnuté na udržanie afinity protilátky k jej antigénu.

Výrazom "menšie modifikácie" sa rozumie, že menej ako celkovo šesť aminokyselín v základnej štruktúre sa môže substituovať inými aminokyselinami. Zvyčajne sa takáto substitúcia lebo modifikácia spravi len keď tieto aminokyseliny sú zapojené do konformačných interakcií, ktoré udržujú základnú štruktúru v patričnom tvare tak, že žiadaný antigén je rozoznávaný protilátkou. Také modifikácie budú obecné odrážať odlišné aminokyseliny prítomné v opičích protilátkach v porovnaní s ľudskými protilátkami. Napríklad aminokyselinová sekvencia ľudskej protilátky tesne pred CDR 3 ťažkého reťazca, 92 - 94, je obecné cysteín-alanín-arginín (o arginíne sa vie, že je v menšej časti protilátok nahradený serínom alebo treonínom); v niektorých protilátkach opice je sekvencia cysteín-alanín-serín; takto v tomto príklade môže byť daná prednosť použitiu serínu ako aminokyseliny 94 (pozri Obr. 9D).

V ďalšom aspekte vynález obsahuje spôsob liečby človeka, ktorý má konkrétny antigén, napr. spojený s chorobou. Spôsob zahŕňa podávanie terapeuticky účinného množstva rekombinantnej protilátky špecifickej ku konkrétnemu antigénu, kde rekombinantná protilátka je taká, že má buď ľudskú alebo šimpanziu konštantnú oblasť a antigén-rozpoznávajúci úsek opičej variabilnej oblasti alebo má konštantnú oblasť prvej opice a antigén-rozpoznávajúci úsek variabilnej oblasti druhej, rozdielnej opice.

Vo výhodných prevedeniach horeuvedeného aspektu je antigén nádorový antigén, antigén zapojený do poruchy imunity, antigén zapojený do autoimúnnej odozvy, receptor exprimovaný na hostiteľských bunkách lebo antigén vybraný z ľudských antigénov CD58, VLA4 (alfa4 β 1 integrín), CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD8, CD23, CD41, CD44, CD45, CD71, TNFalfa, TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, C5a, molekúl adhézie, napr. VCAM, CD54, CD28, CD11a, CD11c, CD18 A CD11b, produktu neu onkogénu, MDR-1 (P-glykoproteínu), TGFalfa a jeho receptoru, a PDGF; a rekombinantná protilátka je

aktívna buď v depletovaní (zabíjaní lebo eliminácii) nechcených buniek (napr. anti-CD4) pôsobením s komplementom, alebo je aktívna ako cytotoxické činidlo, alebo spôsobuje Fc-receptorovú väzbu s fagocytom. Alternatívne protilátka blokuje lebo stimuluje receptorové funkcie, alebo neutralizuje aktívne rozpustné produkty, ako sú jeden lebo viac interleukínov, TNF a C5a.

V ďalšom aspekte vynález obsahuje farmaceutické prostriedky uvedených protilátok alebo ich fragmentov. Prostriedky alebo výrobky podľa vynálezu môžu byť poskytnuté vo forme roztokov vhodných na parenterálne, nasálne lebo orálne podávanie. Vhodné prípravky protilátky môžu byť zmiešané s vhodnými prípravkami iných činidiel, poskytujúc lepšie klinické využitie.

Iné obsahové vlastnosti a prednosti vynálezu budú zrejmé z nasledujúceho popisu výhodných prevedení a z nárokov.

Popis výhodných prevedení

Najskôr sú stručne popísané obrázky.

Obrázky

OBR. 1 je tabelárna reprezentácia dvadsiatich kodónov v deviatich rôznych vedúcich [leader] sekvenciách Ig ťažkých reťazcov a desiatich opíčich sekvenciách Ig ťažkých reťazcov;

OBR. 2 je diagramové znázornenie štruktúr rôznych Ig reťazcov ukazujúce relatívne polohy vedúcich, variabilných a konštantných oblastí vzhľadom ku polohám restričných miest a primerov používaných na amplifikáciu;

OBR. 3 je diagramové znázornenie vektoru s kazetou ťažkého reťazca na expresiu ľuských lebo chimérnych protilátok;

OBR. 4 je diagramové znázornenie vektoru s kazetou ľahkého reťazca na expresiu ľuských lebo chimérnych protilátok;

OBR. 5 a 6 sú diagramové znázornenia vektorov navrhnutých na expresiu imunoglobulínov z cDNA kapa resp. lambda ľahkého reťazca. V týchto vektoroch sú imunoglobulínové gény usporiadané

v tandemovej konfigurácii s použitím neomycín fosfotransferázy ako selekčného markeru;

OBR. 7-1, 7-2 a 8 ukazujú sekvencie nukleových kyselín rôznych primerov vedúcej [leader] sekvencie podľa vynálezu (tieto primery v OBR. 8 zodpovedajú zoznamu ako SEKV. ID č. 1 - 12, nižšie);

OBR. 9A až 9H sú porovnania sekvencií ľudských a opičích VH1, VH2, VH3, VH4 a VH5 oblastí, resp. sekvencií VKI, VKIIm a VLambdaIII;

OBR. 10 je porovnanie ľudských a opičích VH3 sekvencií, s jedným porovnaním k ľudskej VH2 sekvencii;

OBR. 11 je grafické znázornenie väzby protilátky podľa vynálezu k ľudskému CD4 antigénu;

OBR. 12 je grafické znázornenie inhibície väzby 1F3 protilátkou ukázanou v OBR. 10;

OBR. 13 a 14 sú úseky nukleotidových sekvencií anti-CD4 VH a VL oblastí;

OBR. 15 je graf ukazujúci anti-CD54 aktivitu; a

OBR. 16 je histogram porovnávajúci vlastnosti plazmidov expresie.

Opičie protilátky

Opice Starého sveta zahŕňujú tie, ktorým sa hovorí opice baboon a makak (vrátane opice Rhesus a opice cynomolgus). Tento vynález poskytuje podrobnosti použitia nárokovaného vynálezu s rôznymi opičimi génmi. Tieto príklady nie sú obmedzujúce a môžu byť promptne aplikované na iné opice Starého sveta.

Odkazujeme na OBR. 2, kde je diagramovou formou ukázaná obecná štruktúra génov kódujúcich imunoglobulínové ťažké a kapa ľahké a lambda ľahké reťazce. Každý z týchto reťazcov je tvorený ATG štartovacím kodónom nasledovaným vedúcou sekvenciou s približne 60 bázami, oblasťou kódujúcou variabilnú oblasť imunoglobulínu a konštantnou oblasťou tohoto imunoglobulínu.

Príklady rôznych vedúcich sekvencií, čiže signálnych peptidov, ťažkých reťazcov sú ukázané v OBR. 1. Tieto sekvencie a ich ekvivalenty v opiciach sa dajú stanoviť štandardnými technikami dobre známymi tým, čo majú bežné znalosti v obore, ako je popísané nižšie.

Sekvencie ukázané v dolnej časti OBR. 1 sú ľudské vedúce sekvencie. Žiadatelia zistili, že konštrukcia primerov komplementárnych k týmto vedúcim oblastiam umožňuje amplifikáciu Ig génov z opíc. Podobne primery homológne k opičím vedúcim sekvenciám (*pozri napr. hornú časť OBR. 1*) sa dajú použiť na amplifikáciu opičích imunoglobulínových génov a tiež na amplifikáciu ľudských imunoglobulínových génov.

Pri použití takýchto primerov v štandardných amplifikačných postupoch môžu byť gény kódujúce rôzne opičie imunoglobulínové gény ľahko izolované a sekvencie kódujúce variabilné oblasti protilátok stanovené. Príklady takýchto postupov sú poskytnuté nižšie. Výsledky analýz poskytnuté nižšie sú prezentované v OBR. 9A až 9H a v OBR. 10. Žiadateľ prekvapujúco zistil, že napriek schopnosti tvorby protilátok k pomerne konzervovaným ľudským antigénom v opiciach, sekvencie základnej štruktúry [framework] variabilných oblastí takto vytváraných protilátok sú neodlíšiteľné od ľudských protilátok. To znamená: Rozsah [amount] variability v imunoglobulínových sekvenciách pozorovaný u opíc bol podobný rozsahu pozorovanému u ľudí a nebolo možné určiť ktorá protilátka pochádzala z človeka lebo z opice bez analýzy samotného zdroja.

Takto napríklad, s odkazom na OBR. 10, aminokyselinová sekvencia VH3 oblasti človeka bola porovnaná s opičiou. Ľudské protilátky vykazovali rozsah [range] homológie medzi sebou od 83 - 98%, zatiaľčo opičie boli od 90 - 95% homológne s ľudskou VH3 oblasťou. Naproti tomu ľudská VH2 oblasť bola homológna s ľudskou VH3 oblasťou zo 60%. [V tomto obrázku, podobne ako v iných, je prítomnosť rovnakej aminokyseliny v ktorejkoľvek

pozícii označená pomlčkou, zatiaľčo prítomnosť odlišnej aminokyseliny je označená štandardným jednopísmenovým kódom. Pozície, ktorým sa nedá prisúdiť žiadna konsenzová (consensus) aminokyselina sú označené ako X.] Podobne homológie pre VH1, VH2, VH3, VH4 a VH5 a pre VKI, VKIIm a VlambdaIII sú ukázané v OBR. 9A - 9H. Opäť: Pozorovala sa významná homológia medzi opíčimi a ľudskými imunoglobulínovými oblasťmi v každej variabilnej oblasti vrátane sekvencie imunoglobulínovej J oblasti. Takto vysoká homológia je podobná homológii pozorovanej medzi ľudskými protilátkami.

Metodológia, ktorou sa stanovovali sekvencie je uvádzaná nižšie v príkladoch. Tí, čo majú bežné znalosti v obore rozpoznať, že tieto príklady nie sú obmedzujúce pre tento vynález a že rovnocenné výsledky a monoklonálne a chimérne protilátky sa dajú získať podobnými postupmi dobre známymi tým, čo majú bežné znalosti v obore. Vid' napr. U.S. patenty 4 816 567; 4 978 745; 4 975 369; 4 816 397, vyššie. Napríklad po klónovaní génu kódujúceho opíčiu variabilnú oblasť, takýto gén sa dá ľahko ligovať ku génu kódujúcemu opíčiu lebo ľudskú konštantnú oblasť a fúzované gény exprimovať v produkčnej bunecnej línii na produkciu žiadanej protilátky. Nižšie sú poskytnuté príklady takýchto postupov.

V nasledujúcich príkladoch prvý krok postupu zahrňuje izoláciu celkovej RNA z opíčích buniek periférálnej krvi alebo sleziny. B-bunky z imunizovaných opíc sa dajú získať z periférálnej krvi lebo lymfatických uzlín a použiť priamo alebo môžu byť s výhodou expandované. Expanzia môže zahrnúť transformáciu vírusom *Herpes papio*, fúziou k heterológnym myelómovým bunkám alebo klónovanie jednotlivých B-buniek s limitujúcim zriedovaním v prítomnosti stimulujúcich ľudských T-buniek.

Celková RNA sa prevedie na jednovoľáknovú (ss) cDNA reverznou transkriptázou s použitím nešpecifických (oligo-dT alebo náhodných

hexamérov) alebo špecifických (na imunoglobulínové CH1 lebo CK lebo Clambda konštantné oblasti) oligonukleotidových primerov. Jednovláknová cDNA vytvorená touto reakciou sa amplifikuje s použitím polymerázovej reťazovej reakcie, v ktorej sa ss cDNA, spolu s dezoxynukleotid trifosfátmi, DNA polymerázou (napr. termostabilnou polymerázou) a špecifickými primermi použije na amplifikáciu variabilných oblastí ťažkých alebo ľahkých reťazcov imunoglobulínových génov. Použité primery sú jednovláknové syntetické oligonukleotidy medzi 20 až 40 bázami, ktoré obsahujú niektoré degenerované bázy a ktoré sa viažu na imunoglobulínové 5' vedúce sekvencie. Šesť rôznych primerov k 5' vedúcim sekvenciám (pozri Obr. 7-1) zahrnujúcich restriktčné enzýmové miesto (napr. *SalI*) bolo navrhnutých na amplifikáciu rodiny opičích variabilných oblastí ťažkého reťazca na základe ich podobnosti s rodinou ľudských variabilných oblastí ťažkého reťazca. S každým zo šiestich primerov k 5' vedúcim sekvenciám sa použil 3' primer špecifický pre doménu konštantnej oblasti relevantného izotypu (napr. IgG, IgM, IgA lebo IgE) tiež zahrnujúci restriktčné enzýmové miesto (napr. *NheI*). Podobne pre opičie kapa a lambda ľahké reťazce sa používajú iné páry primerov na amplifikáciu príslušných variabilných oblastí ľahkých reťazcov (Obr. 7-2).

Iné súbory primerov sa dajú použiť, aby sa zaviedli rôzne unikátne restriktčné miesta na umožnenie orientovaného klónovania PCR-amplifikovanej DNA do vhodných vektorov exprese obsahujúcich to isté miesto. Súbor primerov viažúcich sa ku 3' koncu vedúcej sekvencie ťažkého reťazca protilátky so zavedeným *MluI* miestom alebo súbor primerov viažúcich sa k prvým 23 bázam sekvencie základnej štruktúry so zavedeným *XhoI* miestom sa dajú tiež použiť, ako je popísané v Obr. 7-1. Variabilné oblasti ťažkých a ľahkých reťazcov opičích imunoglobulínových génov môžu byť klónované do prehadzovacieho [shuttle] vektoru priamo po PCR amplifikácii na umožnenie ďalšej molekulárnej manipulácie ak je

potrebná, alebo klónované priamo do vektoru expresie, ktorý obsahuje konštantné oblasti ťažkých a ľahkých reťazcov ľudských génov. Molekulárna konfigurácia imunoglobulínových génov vo vektore expresie môže byť genómová, v ktorej sú prítomné promótor a zosilovacia sekvencia [promoter/enhancer] a ďalšie regulačné oblasti ako aj zostrihové [splicing] donorové a akceptorové sekvencie na spojeniach intrón/exón. Alternatívne môžu byť chimérne imunoglobulínové gény zavedené do cDNA konfigurácie s použitím heterológnych vírusových promótorov/zosilovacích sekvencií.

Príklad 1: Sekvencia opičích protilátok

OBR. 7 a 8 ukazujú primery s alebo bez restričných miest používané na PCR amplifikáciu imunoglobulínových génov z opičej alebo ľudskej cDNA. Podrobnosti používaných postupov sú poskytnuté nižšie. RNA sa izolovala z opičích slezinných buniek, buniek periférálnej krvi lebo buniek lymfatických uzlín pomocou štandardnej guanidínium izotiokyanátovej metódy. Frakcia celkovej RNA izolovaná podľa tejto metódy sa potom použila ako templát na nasledujúcu amplifikačnú reakciu. Alikvót RNA bol inkubovaný v prítomnosti reverznej transkriptázy z Moloney-ho vírusu myšacej leukémie a nešpecifických (oligo-dT lebo náhodných hexamérov) alebo špecifických (na imunoglobulínové IgG CH1 oblastí, alebo kapa reťazcové konštantné oblasti CK) oligonukleotidových primerov (50 - 100 pikomólov) na vytvorenie nekódujúceho [non-coding sense] vlákna jednovláknovej cDNA. Jednovláknová cDNA vytvorená touto reakciou sa potom amplifikovala s použitím polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction, PCR). Alikvót jednovláknovej cDNA bol inkubovaný spolu s dezoxynukleotíd trifosfátmi (20 μ M), termostabilnou DNA polymerázou (2 - 5 jednotiek) a od ľudských sekvencií odvodenými syntetickými oligonukleotidovými primermi (50 pikomólov) na amplifikáciu variabilných oblastí buď ťažkých alebo ľahkých reťazcov

imunoglobulínových génov.

S použitím párov primerov ukázaných v OBR. 8 bolo amplifikovaných niekoľko reprezentantov cynomolgus imunoglobulínových sekvencií variabilných oblastí ťažkého a ľahkého reťazca z radu génových rodín. Tieto amplifikované sekvencie boli klónované do *EcoRV* miesta plazmidového vektora p-Bluescript (pBS, dostupného od Stratagene, CA) a použité na sekvenovanie. Sekvenovanie DNA sa vykonalo s použitím plazmidu obsahujúceho klónovaný inzert ako dvojvláknového DNA templátu a štandardnej sekvenačnej metódy terminácie reťazca [chain termination].

Reprezentatívne sekvencie imunoglobulínov opice cynomolgus sú ukázané v OBR. 9A - 9H. Obsiahnuté v OBR. 9A - 9H sú aj konsenzus sekvencie aminokyselín pre ľudské gény variabilných oblastí predstavujúce každú z väčších génových rodín variabilných oblastí. Vyznačené je percento homológie každej opičej sekvencie s ľudskou "konsenzus" sekvenciou, s vylúčením domén konštantných oblastí a CDR oblastí. Úroveň homológie medzi ľudskými a opičiami sekvenciami pre danú rodinu je tak vysoká ako medzi ľudskými sekvenciami v rámci tejto rodiny. Preto je nemožné rozlíšenie medzi variabilnými oblasťami imunoglobulínových sekvencií pochádzajúcich z opíc Starého sveta a pochádzajúcich z človeka len na základe samotného porovnania sekvencií.

Izolácia RNA

Opičie antigén-špecifické B- bunky boli získané niekoľkými spôsobmi: Fúziou buniek lymfatických uzlín imunizovaných opíc k partnerským bunkám myšacích/ľudských heteromyelómov línie K5H6/B5 a následným výberom [screening] hybridómových línii, pomocou vírusovej transformácie B- buniek lebo technikou *in vitro* klónovania jednotlivých B-buniek. V poslednom prípade bol rast jednotlivých opičích B-buniek podporovaný *in vitro* ko-kultiváciou s ľudskými T- bunkami, ktoré boli stimulované protilátkou.

Jednotlivé B- bunky sa dávali do jamiek 96-jamkovej platničky na tkáňové kultúry, každá spolu so 150 000 anti-CD3-stimulovaných, mytomicínom C opracovaných ľudských T-buniek. Po dvojtyždňovom inkubačnom období jednotlivé B-bunky expandovali na najmenej 200 diferencovaných plazmatických buniek. V supernatante kultúr z týchto jamiek sa zisťovala prítomnosť imunoglobulínov technikou ELISA s použitím zachycovacej [capture] protilátky, kozieho proti-opičieho imunoglobulínu.

Bunky buď z antigén špecifických vírusom transformovaných buniek alebo hybridómov sa nechali rásť do počtu postačujúceho na extrakciu RNA. Jamky z techniky *in vitro* klónovania jednotlivých B-buniek, ktoré boli pozitívne na imunoglobulíny boli prenesené [removed], dvakrát premyté studeným, fosfátom pufrovaným soľným roztokom pH 7.5 a centrifugované (1000 x g 10 min). Premyté bunky boli suspendované v 100 μ l lyzačného roztoku (4 M guanidínium izotiokyanát, 25 mM citrát sodný pH 7.0, 0.5% natrium sarkozín, 0.1 M 2-merkaptetoetanol). Pridalo sa 10 μ l 2 M octanu sodného, pH 4.0 a premiešalo. Bielkovina sa odstránila pridaním 100 μ l vody sytého fenolu, miešaním a pridaním 20 μ l chloroform/izoamylalkoholu (49:1). Po vortexovaní a inkubácii na ľade 15 min boli vzorky centrifugované 10 000 x g 20 minút. Vodná fáza bola prenesená do novej skúmavky, zmiešaná s rovnakým objemom izopropanolu a inkubovaná 1 hod pri -20°C. Precipitát bol získaný centrifugáciou 10 000 x g 15 minút, premytý 70% etanolom, recentrifugovaný a peleta bola vysušená v prístroji Speedivac (Savant). Vysušená RNA bola znovu rozpustená druhý raz v 100 μ l lyzačného pufu. Bol pridaný rovnaký objem izopropanolu a inkubované 1 hod pri -20°C. Precipitát bol získaný centrifugáciou 10 000 x g 15 minút a premytý 70% etanolom. Peleta bola vysušená v prístroji Speedivac (Savant) a uschovávaná do použitia pri -20°C v 70% etanole.

Syntéza jednovláknovej cDNA

Celková RNA extrahovaná z buniek pochádzajúcich z jednej jamky bola rozpustená v 32 μl redestilovanej vody ku ktorým sa pridá 1 μl (50 - 100 pikomólov) primeru (buď náhodného hexaméru, oligo dT alebo 3' imunoglobulín-špecifického primeru) a 10 μl 5X pufru pre reverznú transkriptázu (0.25 M Tris-HCl pH 8.3, 0.375 M KCl, 15 mM MgCl_2 , 50 mM ditiotreitol). Zmes bola zahriata na 65°C po 5 minút a potom daná do ľadu na 2 minúty. Pridalo sa 5 μl dezoxynukleotid trifosfátov a 1 μl (200 jednotiek) reverznej transkriptázy z Moloney-ho vírusu myšacej leukémie (BRL) a zmes bola inkubovaná pri 1.5 hodiny pri 37°C. Po dobehnutí reverzno-transkriptázovej reakcie sa zmes jednovláknovej cDNA/RNA extrahovala fenol/chloroformom a prehnala cez centrifugačnú [spin] kolónku 1 ml G-25 SEPHADEXu. Materiál, ktorý prešiel cez kolónku sa použil ako templát ss cDNA na PCR amplifikáciu.

Amplifikácia ss cDNA

3-10 μl ss cDNA sa zmiešalo s 10 μl 10X PCR pufru (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl_2) 1.6 μl 1.25 mM dezoxynukleotid trifosfátov, 50 pikomólov špecifického imunoglobulínového 5' primeru, 50 pikomólov špecifického imunoglobulínového 3' primeru a 2 - 5 jednotkami termostabilnej DNA polymerázy (Synthetic Genetics). Reakčný objem bol upravený na 100 μl vodu a prevrstvený 100 μl minerálneho oleja. Reakčná zmes bola inkubovaná pri nasledujúcich teplotách po uvedený čas.

94°C 1 minútu

48°C 2 minúty

72°C 2 minúty

Tento cyklus bol opakovaný 30-35 krát. Amplifikované produkty boli prezerané pomocou elektroforézy v agarózovom gele s použitím 1.2% agarózového gelu a štandardov molekulovej váhy. Produkty PCR

amplifikovaných variabilných oblastí imunoglobulínových génov sa pohybovali približne medzi 350-500 bp štandardmi. PCR amplifikované produkty sa potom použili na klónovanie do vhodných plazmidových vektorov.

Príklad 2: Klónovanie opičích protilátkových génov

Keďže sekvencie variabilných oblastí opičích génov, na cDNA úrovni, sú nerozoznatelné od ľudských členov rovnocennej génovej rodiny, imunitné odpovede na opičie/ľudské chimérne protilátky, ak budú vôbec nejaké, sa nebudú pravdepodobne líšiť od odpovedí, čo sa ~~vykazuje~~ proti molekulám ľudských protilátok.

PCR technológia sa dá využiť na zavedenie špecifických restričných enzýmových miest, vrátane (ale bez obmedzenia) *SalI*, *BglI*, *KpnI* a *NheI* do sekvencií variabilných oblastí opíc Starého sveta behom PCR amplifikačnej reakcie s použitím primerov odvodených od tých, čo sú uvedené v Obr. 6. Existujúce klónované gény boli amplifikované z ich špecifických vektorov s použitím týchto primerov na zavedenie špecifického restričného miesta a následne použité na klónovanie do vektoru expresie. Alternatívne boli tieto primery použité na amplifikáciu priamo z bunečnej RNA.

Použité vektory expresie boli dvoch typov. Prvý (pozri OBR. 3 a 4) umožňuje, aby klónovaná cDNA variabilných oblastí imunoglobulínových génov bola zavedená do kazetového vektoru, s použitím unikátnych restričných miest, v ktorom sú prvky imunoglobulínového génu usporiadané v genómovej konfigurácii. Tento typ vektoru obsahuje imunoglobulínový promótor, dva exóny, ktoré vytvárajú imunoglobulínovú vedúcu sekvenciu, dve klónovacie miesta *SpeI* a *NheI*, poprúdkové [downstream] zostrihové donorové sekvencie, oblasť imunoglobulínovej zosilovacej sekvencie [enhancer], konštantnú oblasť ľudského génu (ťažkého lebo ľahkého reťazca) a poprúdkový polyadenylačný signál. Navyše zahrňujú bakteriálny začiatok replikácie, β -laktamázový gén na bakteriálnu selekciu a neomycín fosfotransferázový gén na G418 selekciu alebo

xantín-guanín fosforibozyltransferázový (gpt) gén na selekciu s mykofenolovou kyselinou v cicavčích bunkách. Vektory expresie pre ťažké a ľahké reťazce používajú, v takomto poradí, neomycín fosfotransferázový gén (Neo) a xantín-guanín fosforibozyltransferázový (Gpt) gén ako selekčné markery.

Druhý typ systému expresie (pozri OBR. 5 a 6) používa imunoglobulínové gény v cDNA konfigurácii. Teda: Medzi 5' vedúcou sekvenciou a 3' sekvenciou konštantnej oblasti nie sú prítomné žiadne intróny lebo zostrihové miesta. Vektor tohoto typu využíva heterológnu promótor/zosilovaciu sekvenciu, ovládajúcu imunoglobulínové gény ťažkého a ľahkého reťazca usporiadané tandémovým spôsobom, polyadenylačnú sekvenciu a selekčný marker pre cicavčie bunky (Neo). Neo gén môže byť pozmenený k slabšej translácii, napr. zámenou kodónov powyše a v náväznosti na štartovné miesto génu z ACC na TCT. Navyše je prítomný gén dihydrofolát reduktázy (dhfr) na následnú amplifikáciu génov metotrexátom. Opičie imunoglobulínové gény variabilných oblastí na klónovanie do vektorov expresie s cDNA konfiguráciou boli amplifikovaná buď z existujúcich klónovaných génov v prehadzovacom [shuttle] vektore lebo priamo z RNA s primermi obsahujúcimi buď restričné miesta *SalI* lebo *MluI* a *NheI* pre ťažký reťazec alebo *BglII* a *KpnI* lebo *BsiWI* pre ľahký reťazec. Iné potenciálne unikátne restričné miesta však nie sú vylúčené.

Chimérne imunoglobulínové gény ťažkého a ľahkého reťazca sú zavedené osobitne alebo postupne (pre konštrukty s genómovou konfiguráciou) alebo do toho istého vektoru (pre konštrukty s cDNA konfiguráciou) pomocou elektroporácie do produkčnej bunecnej línie. Elektroporácia bola použitá na zavedenie linearizovaných DNA konštruktov do buniek buď vaječníkov čínskeho škrečka (Chinese hamster ovary, CHO) alebo myšacích myelómov s následným klónovaním jednotlivých buniek transfektantov do 96-jamkovej platničky na tkanivovú kultúru. Elektroporačné

podmienky používajúce elektroporačné zariadenie BTX-100 (BTX, San Diego) a 1 ml jednorázové plastické kyvety dávali optimálny počet transfektantov na dané množstvo vektorovej DNA. CHO bunky adaptované na rast v suspenzii v bezsérovom médiu (CHO-S SFM II minus hypoxantín a tymidín, Gibco) boli použité s konštruktmi obsahujúcimi vírusové regulačné prvky.

Subklónovanie génov Ig variabilných oblastí

Produkty PCR reakcie sa extrahovali fenol/chloroformom a prehnali cez centrifugačnú [spin] kolónku 1 ml G-25 SEPHADEXu. Ak mal byť DNA fragment zaklónovaný do plasmidu tupými koncami, pridalo sa 1 μ l 1 M $MgCl_2$, 0.5 ml 1.25 mM dezoxynukleotid trifosfátov a 1 μ l Klenow DNA polymerázy (5 jednotiek) k celej PCR reakčnej zmesi a inkubovalo sa 15 minút pri 37°C na zaplnenie všetkých 5' prečnievajúcich koncov. Pred klónovaním tupých koncov do plazmidu boli 5' konce fosforylované ako nasleduje: 5 μ l 10 mM ATP a 1 μ l T4 polynukleotid kinázy (10 jednotiek) bolo pridaných do celkovej reakčnej zmesi a inkubovaných 30 minút pri 37°C. Amplifikované fragmenty, ktoré obsahovali vnútorné restriktčné miesta boli najprv štepené príslušným restriktčným enzýmom a použité priamo na ligáciu bez fosforylácie. V obidvoch prípadoch bol fragment, čo sa mal klónovať, extrahovaný fenol/chloroformom pred ligáciou do príslušného vektoru.

Na ligačnú reakciu bolo zmiešaných 10 % fosforylovaného lebo restriktčným enzýmom štepeného PCR amplifikovaného fragmentu s približne 2 ng príslušného vektoru (celkový objem 8 μ l) predom digerovaného restriktčným enzýmom (enzýmami). Na klónovanie s tupými koncami sa použil pBluescrip digerovaný EcoRV. Na klónovanie s lepivými koncami sa použili vektory TCAE 5.2 lebo 6.0 lebo pGenex-H lebo pGenexL štepené príslušnými restriktčnými enzýmami. Pridalo sa 1 μ l 10X ligačného pufru (500 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP, 10 mM dithio-treitol), 1 μ l T4 DNA ligázy (1 jednotka) a reakcia sa nechala prebiehať pri 14°C

cez noc. Ligovaný materiál sa použil na transformáciu kompetentných buniek *E. coli* HB 101 s použitím štandardnej kalciumpchloridovej metódy transformácie. Transformované baktérie sa selektovali rastom na LB, ampicilín obsahujúcich agarových platniach. Individuálne kolónie boli vybrané a rozrastené cez noc v LB médiu obsahujúcom ampicilín a plazmidová DNA bola extrahovaná s použitím štandardnej metódy s alkalickou lýzou. Po restriktívnej analýze na stanovenie klónov obsahujúcich imunoglobulínové inzerty sa pripravila DNA na sekvenovanie

Sekvenovanie klónovaných génov

Klónované variabilné oblasti imunoglobulínových génov boli sekvenované s použitím štandardnej metódy terminácie reťazca. Dvojvláknová plazmidová DNA obsahujúca klónovaný inzert bola použitá ako sekvenačný templát. Pred sekvenovaním bola dvojvláknová DNA chemicky denaturovaná. DNA bola sekvenovaná s použitím T7 DNA polymerázy SEQUENASE (United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH), rádioaktívne značená dezoxýATP a s nasledujúcimi sekvenačnými primermi: (5' CAGAGCTGGGTACGTCCTCA 3') a (5' GCCCCAGAGGTGCTCTTGG 3') pre variabilnú oblasť G imunoglobulínového ťažkého reťazca v orientáciách 5' ku 3' resp. 3' ku 5'; (5' CAGAGCTGGGTACGTAACC 3') a (5' GGCTGAAGCTCCTCAGAGG 3') pre variabilnú oblasť imunoglobulínového lambda ľahkého reťazca v orientáciách 5' ku 3' resp. 3' ku 5'. Reakčné produkty boli separované na 6%-ných polyakrylamidových géloch a čítané.

Výsledky sekvenovania radu imunoglobulínových génov opíc Starého sveta pre variabilné oblasti ťažkých a ľahkých reťazcov sú zhrnuté v OBR. 9A - 9H. Klónovanie a sekvenovanie imunoglobulínových génov opice rodu cynomolgus nebolo predtým v literatúre popísané. Preto sa ani nedá definovať stupeň homológie medzi V oblasťou génov človeka a cynomolga. Homológia medzi jedným šimpanzím variabilným lambda génom a jeho ľudským

genómovým náprotivkom bola popísaná a ukázala len 2 % rozdielov v oblastiach základnej štruktúry [framework].

Transfekcia a selekcia

Klónované gény variabilných oblastí ťažkých a ľahkých reťazcov boli po sekvenovaní subklónované do príslušných vektorov na expresiu. Týmto môžu byť vektory konštruované s imunoglobulínovými regulačnými prvkami v genómovej konfigurácii (ako sú ukázané v OBR. 3 a 4) lebo s vírusovými regulačnými prvkami v cDNA konfigurácii (ako sú ukázané v OBR. 5 a 6). Príslušné restriktčné miesta (*SpeI* a *NheI*) môžu byť navrhnuté v PCR amplifikačných priméroch behom iniciálneho amplifikačného kroku alebo sa naopak dajú použiť amplifikačné priméry obsahujúce restriktčné miesta pri amplifikácii imunoglobulínových génov z prehadzovacích [shuttle] vektorov do ktorých boli zaklónované. Alternatívne môžu byť imunoglobulínové gény variabilných oblastí priamo klónované do vektorov expresie po amplifikácii z RNA takže subklónovanie nie je potrebné.

Elektroporácia

Elektroporácia sa používala buď na kotransfekciu ťažkoreťazcových a ľahkoreťazcových genómových konštruktov alebo na postupnú transfekciu ťažkoreťazcových a ľahkoreťazcových genómových konštruktov do buniek Sp2/0. Pri postupných transfekciách bola elektroporácia chimérneho ľahkoreťazcového konštruktu nasledovaná selekciou v mykofenolovej kyseline. Testovanie supernatantov bunečnej kultúry z klónov rozrastaných v 96-jamkovej platničke na produkciu ľahkého reťazca antisérom proti ľudskej konštantnej oblasti ľahkého reťazca pomocou techniky ELISA umožňovalo výber klónov s najvyššou expresiou ľahkého reťazca. Následujúca elektroporácia ľahkoreťazcových transfektantov vektorom obsahujúcim opičí/ľudský chimérny imunoglobulínový konštrukt ťažkého reťazca umožňovala výber

transfektómov exprimujúcich chimérnu protilátku žiadanej špecifity a izotypu.

Konstrukt ľahkého reťazca pGENEX-L (OBR. 3 a 4) bol transfekovaný do myšacej myelómovej bunecnej línie Sp2/0 elektroporáciou ako nasleduje: Bunky SP2/0 v koncentrácii $1 \times 10^7/\text{ml}$ v transfekčnom pufre (272 mM sacharóza, 7 mM fosfát sodný pH 7.4, 1 mM MgCl_2) boli zmiešané s 50 μg pGENEX-L obsahujúcim príslušný klónovaný gén ľahkého reťazca, ktorý bol predom linearizovaný digesciou restriktčným enzýmom PvuII. Bunky boli dané do 1 ml jednorazovej plastikovej spektrofotometrovej kyvety a do kyvety boli zavedené ploché elektródy vzdialené 3.5 mm. S použitím transfekčného aparátu BTX-100 (BTX, Inc.) bunky dostali puls prúdu po 500 mikrosekúnd taký, že došlo k usmrteniu približne 50 % buniek. Táto hodnota bola stanovená pred transfekciou pulzovaním buniek, bez prítomnosti DNA, zvyšovaným napätím a meraním počtu buniek prežívajúcich po 24 hodinách neskôr. Napätie proti viabilite buniek bolo graficky vynesené a napätie zodpovedajúce 50 % usmrtenia buniek sa používalo vo všetkých nasledujúcich elektroporačných pokusoch. Pri použití aparátu BTX-100 bolo zistené, že optimálnu hodnotu má pulz s amplitúdou 200 počas 500 mikrosekúnd. Bunky boli po pulzovaní ponechané vspamätať sa [recover] na ľade 15 minút predtým ako sa preniesli do 96-jamkovej platničky na tkanivovú kultúru do Dulbeccovho modifikovaného Eaglovho média (DMEM) obsahujúceho 5% fetálne telacie sérum a 10% Sp2/0 upravené [conditioned] médium. Bunky boli nanesené [plated] v koncentrácii, pri ktorej bol bunecný rast pozorovaný v približne jednej z troch jamiek po selekcii príslušnou zlúčeninou. Tento parameter bol stanovený pre každý elektroporačný pokus nanášaním rôzneho počtu elektroporovaných buniek na jamku (1000 - 10 000) a selekciou na bunky, ktoré inkorporovali plazmid. Počet jamiek, ktoré vykazovali bunecný rast bol na každej platničke počítaný po 2 - 3 týždňoch selekcie. Takto bol vhodný počet buniek, ktoré

dávali jednu pozitívnu jamku z troch pri danej koncentrácii konkrétneho plazmidu, stanovený pre použitie v budúcich pokusoch.

Priamo po elektroporácii boli bunky dané do média bez selektujúcej zlúčeniny [drug]. Čerstvé médium obsahujúce buď G418 alebo mykofenolovú kyselinu pre bunky vykazujúce neomycín fosfotransferázovú resp. guanozyl fosfotransferázovú aktivitu bolo pridané dva dni po elektroporácii. Bunkám bolo vymieňané médium každé dva dni behom prvého týždňa a potom dva razy za týžden. Koncentrácia zlúčeniny použitej na selekciu bola stanovená inkubáciou buniek v prítomnosti jej zvyšovanej koncentrácie a sledovaním viability buniek. Použitá koncentrácia bola dva razy vyššia ako tá, čo dávala 100 % usmrtenia buniek. Pre Sp2/0 bolo približne treba 1 μg mykofenolovej kyseliny/ml a pre G418 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Bunky boli elektroporované na niekoľko spôsobov: Buď boli ko-elektroporované ťažkoreťazcovými a ľahkoreťazcovými genómovými vektormi (pGenex-H a pGenex-L) alebo boli elektroporované ľahkoreťazcovými samotnými. V druhom prípade boli klóny vyberané [screened] podľa vysokej expresie chimérneho imunoglobulínového ľahkého reťazca s použitím techniky ELISA. Tieto klóny boli rozrastené a elektroporované vektorom obsahujúcim ťažký reťazec. Ak sa použili cDNA tandémové génové konštrukty, vektor expresie (TCAE5.2 lebo TCAE6) bol napred linearizovaný digesciou s restriktčným enzýmom NotI. Jediná elektroporácia dostačovala na dosiahnutie integrácie obidvoch génov, pre ťažký aj pre ľahký reťazec. Po 2 - 3 týždňoch boli supernatanty z jamiek, v ktorých pokračoval rast s príslušnou selektujúcou zlúčeninou skúšané [assayed] na sekréciu chimérnych imunoglobulínových ľahkých reťazcov lebo celých imunoglobulínov s použitím techniky ELISA. Imunoglobulínové gény v cDNA konfigurácii boli elektroporované buď do Sp2/0 buniek lebo do buniek vaječníkov čínskeho škrečka (CHO) adaptovaných na rast v suspenzii v bezsérovom médiu. CHO

bunky boli elektroporované s použitím elektroporačného aparátu BTX 600 nastaveného na podmienky pre dosiahnutie maximálneho počtu G418 rezistentných kolónií. Boli nimi 210 voltov, 400 μ F a 13 ohmov. Po elektroporácii boli bunky počítané, premyté transfekčným pufrom, resuspendované v tom istom pufre a dané na ľad na 15 minút. Bunky boli nastavené na 1×10^7 živých buniek/ml a 400 μ l bunečnej suspenzie bolo daných do 0.4 ml sterilnej jednorazovej kyvety (BTX Inc.). 25 μ l Not 1 linearizovaného DNA TCAE 5.2 lebo TCAE 6 vektoru, obsahujúceho klónované gény variabilnej oblasti imunoglobulínov makaka bolo resuspendovaných v TE pufre (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) na 1 μ g/ml a pridaných k bunečnej suspenzii. Elektroporácia sa vykonala vybitím aparátu s použitím tlačítka na automatické nabitie a pulz. Kyveta sa dala na ľad na 15 minút a bunky boli zriedené do 120 ml bezsérového média a dané do šiestich 96-jamkových dosťičiek (200 μ l na jamku, obsahujúcich približne 6 667 buniek lebo 3 333 živých buniek na jamku). Nezávislé elektroporačné parametre boli stanovené pre túto bunečnú líniu a selekcia G418 prebiehala pri 400 μ g/ml.

Vyhľadávanie produkcie protilátok

Prítomnosť ľudských, opičích lebo chimérnych protilátok secernovaných transfektantmi bola zisťovaná technikou ELISA ako nasleduje: 96-jamkové platničky s plochým dnom (Dynatech) boli pokryté [coated] kozím anti-ľudským IgG lebo kapa pri 200 ng/jamku v pokrývacom pufre (uhličitan sodný 0.8 mg/ml, kyselý uhličitan sodný 1.55 mg/ml, pH 9.6) a inkubované najmenej 16 hodín pri 4°C. Pokrývací pufer bol odstránený a jamky blokovanie 120 μ l blokovacieho pufru (1% bovinný sérumalbumín vo fosfátom pufrovanom soľnom roztoku obsahujúcom 0.2% azid sodný) a inkubované 1 hod pri 37°C. Supernatant bunečnej kultúry v množstve až 125 μ l bol pridaný do jamiek obsahujúcich blokovací pufer a platnička bola inkubovaná 2 hod pri 37°C. Platničky boli

potom päť razy premyté PBS. Pridalo sa 100 µl kozieho anti-ludského IgG (lebo kapa) značeného chrenovou peroxidázou, riedeného 1:1000 - 1:5000 v zriedovacom pufre (1% bovinný sérumalbumín, 0.05% Tween-20, 0.02% azid sodný v PBS). Platničky boli inkubované 1 hod pri 37°C a potom päť razy premyté PBS. Chimérna protilátka bola detegovaná so 100 µl peroxidu vodíku a substrátu, 3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidínu (1:1 v/v) na jamku. Farebná reakcia bola zastavená po 2 až 5 min so 100 µl 2 M kyseliny sírovej na jamku.

Tí, čo majú bežné znalosti v obore môžu ľahko vykonať metodológie rovnocenné tým, čo sú vyššie popísané. Príklady takejto technológie zahŕňujú imortalizáciu selektovaných B-buniek hybridomovou fúziou, ako je popísané vyššie, s bunečnou líniou K5H6/B5 popísanou Carrollom et al. 164 J. Experimental Medicine 1566, 1986, lebo ekvivalentnou bunečnou líniou, ako je SPAZ4 (dostupnou od Sandoz, pozri Ehrlich et al., 34 Clin. Chem. 1681, 1988). Podobné bunečné línie sa dajú ľahko konštruovať štandardnými technikami verejne dostupnej metodológie. Alternatívne môžu byť imunoglobulínové gény klónované z: (a) buniek imortalizovaných virálnou transformáciou *Herpes papio*, ako popisuje Markova et al., 30 Vopr. Virusol. 549, 1985, lebo ekvivalentným vírusom, (b) klónovaním jednotlivých B-buniek na poskytnutie tranzientnej imortalizácie, ako popisuje Amaroso a Lipske 145 J. Immunology 3155, 1990, lebo (c) s použitím bakteriofágových knižníc rekombinantných imunoglobulínov, ako popisuje Huse et al., 246 Science 1275, 1989 a McCefferty et al., 348 Nature 552, 1990. Výber [screening] klónov obsahujúcich príslušnú protilátku sa dá vykonať technikami popísanými vyššie, alebo rovnocennými technikami dobre známymi tým, čo majú bežné znalosti v obore, a žiadané imunoglobulínové gény sa dajú získať [rescued] z imortalizovaných bunečných línií. Navyše sa dá opičia protilátka produkovaná izolovanými opičiami B-bunkami používať pre humánnu terapiu, bez manipulácie na vytvorenie chimérnej

protilátky.

Ľudské konštantné oblasti sa dajú získať štandardnými technikami so všetkými žiadanými izotypmi dobre známymi tým, čo majú bežné znalosti v obore, a variabilné oblasti opičích protilátok sa dajú ligovať s takouto ľudskou konštantnou oblasťou. Osobitne účitočné chimérne protilátky proti špecifickým ľudským povrchovým bunecným receptorom, ktoré sa dajú použiť pri humánnej imunoterapii, zahŕňujú CD4, ICAM, CD19, CD20, CD8, CD11a, CD11b, CD28, CD18, CD45, CD71, a TCR.

Príklad 3: Klónovanie a expresia opičej/ľudskej chimérnej protilátky so špecifitou pre CD4

Nasleduje je konkrétny príklad postupov a protilátok podľa vynálezu.

Vytváranie línii opičích imortalizovaných B-buniek

Dospelá opica cynomolgus (White Sand New Mexico Primate Center) bola imunizovaná intramuskulárne, na viac miestach, so 150-300 µg rozpustného CD4 (sCD4) lebo bunecnými membránami (1×10^8 buniek) z CD4-pozitívnej bunecnej línie supT1 s použitím štandardného adjuvans. Imunizácia bola opakovaná každé 2-3 týždne, celkovo 6 razy. Opica dostala zosilovaciu dávku [was boosted] injekciou 100 µg sCD4 do inguinálnej oblasti jedného stehna a po jednom týždni bola chirurgicky odobraná lymfatická uzlina toho istého stehna. Lymfocyty sa získali z lymfatickej uzliny rozrezaním [slicing] tkáne a premytím sterilným DMEM médiom. Bunecná suspenzia bola prefiltrovaná cez nylonovú gázu a centrifugovaná pri 1000 x g po 10 minút.

Približne 1×10^8 lymfocytov bolo suspendovaných v Tris - amóniumchloridovom pufre (16 mM, pH 7.5) a zohriatych na 37°C, aby sa lýzovali erytrocyty. Lymfocyty sa centrifugovali a resuspendovali v L-leucín metylestere (LME) a inkubovali pri 37°C 45 minút. LME-opracované bunky sa filtrovali cez nylonovú sieťku

a centrifugovali. Pridal sa 1 ml fetálneho telacieho séra, bunky sa suspendovali a premývali dva razy bezsérovým RPMI. Bunky sa spočítali a dali do jedinej 50 ml kónickej centrifugačnej skúmavky spolu s rovnakým počtom K6H6/B5 heteromyelómových buniek, predom premytých dva razy bezsérovým médiom. Bunky boli jemne suspendované v 1 ml 50% PEG (polyetylénglykol) pridaného pomaly s jemným miešaním [stirring] behom 1 minúty. Bunky boli potom resuspendované pridaním 20 ml bezsérového média behom 5 minút s jemným miešaním [mixing] aby sa vyriedil PEG. Po dvojnásobnom premytí bezsérovým médiom boli bunky resuspendované na koncentráciu 5×10^5 buniek / 0.1 ml v RPMI médiu obsahujúcom 20% fetálne telacie sérum a gentamycín a dané do 96-jamkových platničiek na tkáňové kultúry, 0.1 ml na jamku. Do každej jamky sa pridal rovnaký objem (0.1 ml) HAT média a bunky boli ponechané rásť pred testovaním [screening] 14-17 dní.

Testovanie fúzovaných bunečných hybridov na produkciu anti-CD4

Test na určenie anti-CD4 špecifity bol ako nasledujúci. ELISA platničky boli pokryté rekombinantným sCD4 pri koncentrácii 100 ng na jamku a blokové 1% bovinným sérumalbumínom v PBS. 50 µl alikvót hybridomového supernatantu sa odoberal z každej jamky a nechal inkubovať s platňou pokrytou sCD4 60 minút. Väzba sa detegovala pomocou inkubácie s ^{125}I -značeným kozím proti-ludským lebo kozím proti-opičím IgG po 60 minút. Po štvornásobnom premytí destilovanou vodou sa jamky merali v gama počítaci. Pozitívne jamky sa duplicitne znovu testovali a hybridómové bunky z týchto jamiek sa subklónovali tri razy, raz pri 5 bunkách na jamku a dva razy pri 1 bunke na jamku. V tomto štádiu boli anti-CD4 pozitívny testované na schopnosť viazať bunečný povrchový CD4. Toto sa vykonalo inhibíciou väzby myšacieho anti-CD4 monoklonálu, zvaného 1F3, k CD4 pozitívnej bunečnej línii supT1. V stručnosti to robilo ko-inkubáciou rôzneho množstva opičej anti-CD4 a 10 ng ^{125}I -značeného 1F3

s 3×10^5 buniek na jamku v 96-jamkovej platničke. Po inkubácii po 1 hodinu pri izbovej teplote (asi $20-25^{\circ}\text{C}$) boli bunky prenesené pomocou vákua na filtre zo sklenených vlákien. Po extenzívnom premývaní PBS boli filtre merané v gama počítaci na určenie inhibície väzby 1F3 k supT1 bunkám opičími hybridómovými supernatantmi.

Bol vybraný kandidátny klón, ktorý produkoval protilátku, ktorá vykazovala silnú inhibíciu proti 1F3. Klón, čo sme vybrali bol izotypovaný s použitím ľudských izotypovacích reagentov a určený ako IgG2 s lambda ľahkým reťazcom. Táto bunčná línia bola rozrastaná do väčších počtov na klónovanie jej imunoglobulínových génov.

Klónovanie génov variabilných oblastí ťažkých a ľahkých reťazcov z opičích imortalizovaných B-buniek

Celková RNA bola izolovaná z 1×10^7 opičích imortalizovaných B-buniek s použitím guanidínium izotiokyanátovej metódy popísanej vyššie. Jedna desatina celkovej RNA sa použila na vytvorenie jednovláknovej cDNA s použitím oligo-dT oligonukleotidového primeru a reverznej transkriptázy, tiež ako je popísané vyššie. Jedna desatina z množstva ss cDNA sa použila na nastavenie PCR reakcie. Zo šiestich PCR reakcií každá zahrnovala jeden zo šiestich oligonukleotidových primerov špecifických pre 5' V_H rodinu, obsahujúci SalI restričné miesto spolu s oligonukleotidom pre IgG 3' konštantnú oblasť, obsahujúcim NheI miesto, ako je obidvoje ukázané v Obrázku 7-1. Podobne sa nechalo prebehnúť päť PCR reakcií s použitím jedného z piatich oligonukleotidových primerov pre 5' lambda vedúcu sekvenciu, obsahujúcich BglII miesto a primer pre IgG 3' lambda konštantnú oblasť, obsahujúci AvrII miesto. Podmienky reakcie boli ako je popísané vyššie. Každá PCR reakcia prebehla v triplikátoch. Reakčné produkty každej amplifikácie ťažkého a ľahkého reťazca boli analyzované na 1.2% agarózových géloch.

Primer VH4 ťažkého reťazca (SEKV. ID. Č.: 13: 5' ACTAAGTC GACATGAAACACCTGTGGTTCTT 3') a lambda primer (SEKV. ID. Č.: 14: 5' ATCACAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTCTCCTCC 3') poskytovali silné pruhy pri agarózovej gelovej elektroforéze. Produkty týchto reakcií boli použité na klónovanie do vektoru TCAE 6, ktorý obsahuje sekvencie ľudského IgG1 a ľudskej lambda konštantnej oblasti.

Klónovanie dvoch génov variabilných oblastí do vektoru expresie TCAE 6 sa vykonalo postupne. Napred boli ťažkoreťazcový PCR produkt a vektor TCAE 6 digеровané restriknými enzýmami *SalI* a *NheI*, extrahované fenol/chloroformom a prehnané cez centrifugačnú [spin] kolónku 1 ml G-25 SEPHADEXu. PCR produkty boli ligované do rozšτεpeného vektoru cez noc pri 14°C v prítomnosti T4 DNA ligázy. Približne celkovo 500 ng DNA sa ligovalo v objeme 10 µl pri molárnom pomere inzert/vektor 10:1. Ligovaný materiál sa použil na transformáciu XL-1 Blue kompetentných bunike (Stratagene) a transformované bunky boli nanesené na LB agarové platne obsahujúce 50 µg / ml ampicilín. Kolónie ampicilín-rezistentných baktérií boli vzaté [picked] a rozrasteené v 5 ml minikultúrach. Z každej tejto kultúry sa DNA extrahovala štandardným postupom alkalickej lýzy, šτεpila restriknými enzýmami *SalI* a *NheI* a produkty sa delili na 1.2% agarózovom géle. Plazmidy s inzertmi približne 450 bp sa použili ako templáty na následné klónovanie variabilných oblastí ľahkého reťazca. Produkt ľahkoreťazcovej PCR reakcie ako aj plazmid obsahujúci ťažkoreťazcový inzert boli digеровané restriknými enzýmami *BglII* a *AvrII* a ligované dokopy. Plasmidové minikultúry boli testované so šτεpením *BglII* a *AvrII*. Digesty dávajúce inzert s približne 400-450 bp sa počítali za pozitívne. Plazmidy obsahujúce obidva inzerty, *SalI* / *NheI* a *BglII* / *AvrII*, boli narastané vo väčších množstvách na sekvenovanie DNA.

Vektory TCAE 5.2 a TCAE 6 na tandémovú expresiu chimérnych protilátok sú odvodené z vektoru CLDN, ktorý sám je derivátom

vektoru RLDN10b (253 Science 77-79, 1991). RLDN10b je pritom derivát vektoru expresie TND (7 DNA 651-661, 1988).

RLDN10b sa líši od vektoru TND nasledujúcimi spôsobmi: Transkripčná kazeta dihydrofolát reduktázy (DHFR) (promótor, cDNA a polyadenylačná oblasť) bola umiestnená medzi kazetu aktivátoru tkáňového plazminogénu (kazetu t-PA expresie) a kazetu neomycín fosfotransferázy (NEO) tak, že všetky tri kazety sú v tandéme a v rovnakej transkripčnej orientácii. Navyše, promótor génu DHFR v CLDN bol nahradený myšacím beta globínovým hlavným [major] promótorom (3 Mol. Cell Biol. 1246-54, 1983) a t-PA cDNA nahradená polylinkerom. Všetky tri eukaryotické transkripčné kazety (expresia, DHFR, NEO) môžu byť separované z plazmidovej DNA (derivátu pUC9) digesciou restričnou endonukleázou *NotI*.

CLDN sa líši od RLDN10b pretože Rous LTR pred polylinkerom bol nahradený zosilovaciou sekvenciou [enhancer] promótoru ľudského cytomegalovírusového okamžitého včasného [immediate early] génu (41 Cell, 521, 1985).

Vektory expresie TCAE 5.2 a TCAE 6 sa líšia od CLDN tak, že:

1) Obsahujú štyri transkripčné kazety (miesto troch), v tandémovom poradí:

(a) Konštantnú oblasť ľahkého reťazca ľudského imunoglobulínu odvodenú z amplifikácie cDNA polymerázovou reťazovou reakciou. V TCAE 5.2 je to kapa konštantná oblasť ľahkého reťazca ľudského imunoglobulínu (aminokyseliny 108-214 v Kabatovom číslovaní, alotyp Km3) a v TCAE 6 lambda konštantná oblasť ľahkého reťazca ľudského imunoglobulínu (aminokyseliny 108-215 v Kabatovom číslovaní, genotyp Oz mínus, Mcg mínus, Ke mínus alotyp)

(b) Konštantnú oblasť ťažkého reťazca ľudského imunoglobulínu; v obidvoch konštruktoch ťažkého reťazca ľudského imunoglobulínu je to bola gama 1 konštantná oblasť (aminokyseliny 114-478 Kabatovom číslovaní alotyp Gmla, Gmlz), ktorá bola odvodená amplifikáciou cDNA pomocou polymerázovej reťazovej

reakcie.

(c) DHFR; obsahujúcu vlastný eukaryotický promótor a polyadenylačnú oblasť.

(d) NEO; tiež obsahujúcu vlastný eukaryotický promótor a polyadenylačnú oblasť.

3) Kazety ľahkého a ťažkého reťazca ľudských imunoglobulínov obsahujú syntetické signálne sekvencie pre sekréciu imunoglobulínových reťazcov.

4) Kazety ľahkého a ťažkého reťazca ľudských imunoglobulínov obsahujú špecifické DNA spojky [linkers] ktoré umožňujú inzerciu variabilných oblastí ľahkého a ťažkého reťazca ľudských imunoglobulínov so zachovaním translačného čítacieho rámca a nemenia aminokyseliny normálne nachádzané v imunoglobulínových reťazcoch. Zavedenie popísaných zmien viedlo ku konštrukcii vektorov TCAE 5.2 a TCAE 6. Klónovanie génov variabilných oblastí ľahkého a ťažkého reťazca ľudských imunoglobulínov z anti-CD4 heterohybridómovej bunecnej línie E9.1 do TCAE 6 viedlo ku konštruktu, ktorý je uložený v ATCC. Konštrukt ktorý bol uložený obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu opice cynomolgus a variabilnú oblasť ľahkého reťazca imunoglobulínu opice cynomolgus, ktorých sekvencie sú v Obrázkoch 13 resp. 14, klónované z anti-CD4 hybridómovej bunecnej línie E9.1. Konštantná oblasť ťažkého reťazca je ľudského pôvodu, gama 1 izotypu a Gmla, Gmlz alotypu. Konštantná oblasť lambda ľahkého reťazca je tiež ľudského pôvodu, Oz mínus, mcg mínus izotypu a Ke mínus alotypu. Imunoglobulínové gény sú klónované do vektoru expresie TCAE 6, ukázaného v Obrázku 6, ktorý, keď bol elektroporovaný do cicavčej bunecnej línie CHO, produkoval opičiu/ľudskú chimérnu anti-CD4 protilátku. Tu popísaný DNA konštrukt bol použitý na transformáciou bakteriálneho kmeňa XL-1 Blue, selektovaný antibiotikom ampicilínom a uložený ako suspenzia bakteriálnych buniek v sterilnom LB médiu obsahujúcim 15 % glycerólu.

Iný užitočný systém expresie je taký, v ktorom je gén

kódujúci selekčný marker pozmenený na zvyšovanie výťažku rekombinantného systému kódujúceho žiadanú sekvenciu. Napríklad narušenie translačnej iniciácie dominantného selekčného markeru vedie ku zníženiu počtu rezistentných kolónií, ale každá individuálna kolónia exprimuje význačne vyššie hladiny pripojeného [colinked] génového produktu ako v nenarušenom vektore. Napríklad translačná iniciácia je prvým krokom v proteosyntéze. Miesto translačnej iniciácie neomycín fosfotransferázového génu (génu G418 rezistencie) bolo zmenené z Kozakovej konsenzu (sekvencia ccAccATGG) na slabšie Kozakovej miesto [a poor Kozak] (sekvencia ccTccATGC). Narušenie translačnej iniciácie génu G418 rezistencie malo za následok: 1) významné (pätnásobné) zníženie počtu G418 rezistentných kolónií získaných z rovnakého množstva plazmidovej DNA transfekovanej na bunku a 2) významné zvýšenie množstva exprimovaného produktu pripojeného génu v každom klóne. V klónoch obsahujúcich Kozakovej konsenzus 73 % testovaných kolónií produkovalo menej ako 25 ng / ml, s len 3 % produkujúcimi viac ako 100 ng / ml. Pre klóny s pozmeneným, slabším Kozakovej miestom 8 % testovaných kolónií produkovalo menej ako 25 ng / ml v porovnaní s 63 % kolónií produkujúcich viac ako 100 ng / ml. Konkrétne, s odkazom na Obr. 16 (kde TCAE 5.2 má Kozakovej konsenzus a TCAE 12 má slabšie Kozakovej miesto), 258 kolónií bolo odvodených z dvoch elektroporácií 25 µg DNA, ktorá obsahuje neomycín fosfotransferázový gén z konsenzus (nezmeneným) miestom štartu translácie. 201 z týchto kolónií (78 %) neexprimuje žiadny detegovateľný génový produkt (t.j. < 25 ng / ml chimérneho imunoglobulínu) a len 8 kolónií (3 %) exprimovalo viac ako 100 ng / ml. 98 kolónií bolo odvodených zo šiestich elektroporácií 25 µg DNA, ktorá obsahuje neomycín fosfotransferázový gén z pozmeneným miestom štartu translácie. 63 % týchto kolónií exprimovalo viac ako 100 ng / ml a len 8 % z týchto kolónií exprimovalo menej ako 25 ng / ml.

Sekvenovanie DNA

Plasmidová DNA sa pripravovala zo 100 ml kultúr. Bola ďalej čistená zrážaním (1 objem) zmesou 2.5 M chloridu sodného a 20% polyetylénglykolu (6 objemov) na ľade 15 minút. Po centrifugácii 10 000 x g 15 minút bola peleta premytá 70% etanolom, recentrifugovaná a vysušená v prístroji Speedivac (Savant). Peleta bola resuspendovaná v dejonizovanej vode na koncentráciu 150-250 µg / ml. Sekvenovanie sa vykonalo na 5 µg dvojvláknovej DNA s použitím Sangerovej metódy. Použili sa sekvenačné primery, ktoré boli homológne k sekvenciám vektoru expresie nad a pod inzertom buď ľahkého alebo ťažkého reťazca. Inzerty boli sekvenované v oboch smeroch, 5' ku 3' a 3' ku 5'. Dva klóny anti-CD4 ľahkého reťazca a dva klóny anti-CD4 ťažkého reťazca, každý generovaný v osobitej PCR reakcii, boli sekvenované paralelne, aby sa stanovilo, či sa behom PCR reakcie zavádzajú nejaké zmeny nukleotidov. Pre obidva vybrané klóny ťažkého reťazca a pre obidva vybrané klóny ľahkého reťazca sa zistila identita po celej dĺžke, podvrdzujúca, že sa behom amplifikačného procesu nezavádzali žiadne chyby. Sekvencia anti-CD4 ťažkých a ľahkých reťazcov je ukázaná v Obrázkoch 13 a 14 a Zozname sekvencií, Čís.: 15 a 16.

Expresia opičej/ľudskej chimérnej anti-CD4

Vektor expresie TCAE 5.2 a TCAE 6 sa dá používať nielen na stabilne integrovanú expresiu v bunčných líniiach Sp2/0 a CHO, ale, pretože obsahuje SV40 počiatok, môže tiež byť exprimovaný tranzientne v bunčnej línii COS. Expresia v COS bunkách sa vykonala ako nasleduje: COS bunky boli očkované jeden deň pred transfekciou tak, aby boli 50-70% konfluentné nasledujúci deň. Kultivačné médium bolo odstránené a bunky premyté dva razy transfekčným pufrom (Transfection Buffer, TB - 140 mM NaCl, 25 mM Tris, 5 mM KCl, 0.5 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂).

30 µg cézium chloridom purifikovaného plazmidu TCAE 6 obsahujúceho anti-CD4 opičie/ľudske chimérne ťažké a ľahké imunoglobulínové reťazce bolo zmiešaných s 3 ml DEAE dextranu na miskú (1 mg/ml v TB). DNA sa nechala inkubovať s bunkami 1 hodinu pri 37°C. Roztok DNA bol odstránený a nahradený 3 ml 20% glycerolu na 1.5-2.5 minút, po ktorom sa bunky dvakrát premyli TB. Bunky boli inkubované v 5 ml čerstvého média obsahujúceho 100 µM chlóróchín [chloroquine] 3-5 hodín pri 37°C, po ktorom boli dvakrát premyté médiom a inkubované s normálnym DMEM 72 hodín. Supernatant (100 µl) transfekovaných COS buniek bol v rôznych riedeniach analyzovaný na prítomnosť protilátky technikou založenou na ELISA. Kozie protiľudske lambda sa použili na pokrytie 96-jamkovej testovacej platničky a peroxidázou značené kozie protiľudske IgG ako detekčná protilátka, pri štandardných ELISA podmienkach. S COS bunkami bola stanovená produkcia medzi 10 a 40 ng / ml opičej/ľudskej chimérnej protilátky. Väčšie objemy supernatantu boli zakoncentrované 10 razy a použité v priamej väzbe RIA k CD4 pozitívnym supT1 bunkám. Rodičovská celá opičia protilátka a irelevantný ľudský imunoglobulín boli použité ako pozitívne resp. negatívne kontroly (Obr. 11). Ďalej: Opičie anti-CD4 a opičie/ľudske chimérne chimérne anti-CD4 boli použité na inhibíciu väzby vysokoafinitnej myšacej anti-CD4 (1F3) protilátky (Obr. 12). Je vidno, že opičia/ľudská rekombinantná protilátka (ATCC No. _____) sa nielen viaže k CD4 pozitívnym bunkám ale je aj schopná inhibovať väzbu 1F3 k CD4 pozitívnym bunkám v približne rovnakých koncentráciách ako plne opičia protilátka lebo samotná 1F3.

Následuje je príklad postupov a protilátok podľa vynálezu.

Príklad 4: Generovanie opičích protilátok proti ľudským leukocytovým antigénom

Dospelá opica cynomolgus (White Sand New Mexico Primate Center) bola imunizovaná intramuskulárne, na viac miestach,

s 5×10^8 celých CD54-pozitívnej ľudských leukocytov. Alternatívne boli použité SB bunky (ľudská B lymfoidná línia) a aktivované periférálne ľudské lymfocyty, aktivované preinkubáciou so zmesou *Phytolacca* mitogénu (2.5 mg/ml), forból monoacetátu (40 nM) a fytohemaglutinínu so zahrnutím štandardného adjuvans. Imunizácia bola opakovaná každé 2-3 týždne po období ôsmich mesiacov. Séra z imunizovaných zvierat boli testované v rôznych časoch inhibíciou väzby myšacej protilátky, 84H10, o ktorej je známe, že sa viaže k ICAM-1. Saturačné množstvo 84H10 bolo naviazané k bunkám vaječníkov čínskeho škrečka (CHO), predom transfekovaných vektorom expresie obsahujúcim ľudskú CD54 c-DNA a selektovaných na vysokú expresiu bunecného povrchového CD54, spolu so zvyšujúcim sa riedením opičieho séra. Inhibícia väzby 84H10 je ukázaná v OBR. 15.

Iné myšacie monoklonálne protilátky ktoré rozoznávajú iné ľudské leukocytové antigény boli testované inhibíciou s použitím opičích sér získaných tou istou imunizačnou metódou.

Použitie

Protilátky vytvorené spôsobom popísaným vyššie, alebo rovnocennými technikami, sa dajú purifikovať afinitnou chromatografiou alebo chromatografiou podľa molekulovej veľkosti [size exclusion] na charakterizáciu vo funkčných biologických analýzach. Tieto analýzy zahrňujú stanovenia špecifity a väzobnej afinity ako aj efektorových funkcií spojených s exprimovaným izotypom, napr. ADCC lebo fixáciou komplementu. Takéto protilátky môžu byť použité ako pasívne lebo aktívne terapeutické činidlá proti radu ľudských chorôb, vrátane B-bunkových lymfómov, infekčných chorôb vrátane AIDS, autoimúnnych a zápalových chorôb a transplantácií. Protilátky môžu byť použité buď vo svojich natívnych formách alebo ako časť komplexov protilátka/chelát, protilátka/liečivo lebo protilátka/toxín. Navyiac môžu byť celé protilátky lebo fragmenty protilátok (Fab_2 , Fab, Fv) použité ako

zobrazovacie činidlá alebo ako potenciálne vakcíny alebo imunogény v aktívnej imunoterapii na generovanie anti-idiotypových odpovedí.

Množstvo protilátky užitočné na preukázanie terapeutického účinku sa dá stanoviť štandardnými technikami dobre známymi tým, čo majú bežné znalosti v obore. Protilátky budú obecné poskytované štandardnými technikami vo farmaceuticky prijateľnom pufre, a môžu byť podávané akoukoľvek žiaducou cestou. Z dôvodov účinnosti tu nárokováných protilátok a ich tolerovania ľuďmi je možné tieto protilátky podávať opakovane, aby sa bojovalo s rôznymi chorobami alebo chorobnými stavmi v človekovi.

Anti-CD4 rekombinantné protilátky (lebo ich fragmenty) podľa vynálezu sú tiež užitočné na navodenie imunosupresie, t.j. navodenie supresie ľudského alebo zvieracieho imunitného systému. Tento vynález sa preto týka spôsobu profylaktického alebo terapeutického navodenia imunosupresie v človekovi alebo inom živočíchovi, u ktorého je to potrebné, podávaním účinného, netoxického množstva takejto protilátky podľa vynálezu takémuto človekovi alebo inému živočíchovi.

Schopnosť látok podľa tohoto vynálezu vyvolávať imunosupresiu sa dá ukázať v štandardných testoch používaných pre tento účel, napríklad zmesným lymfocytovým reakčným testom lebo testom merajúcim inhibíciu proliferácie T-buniek meranú spotrebou [uptake] tymidínu.

Skutočnosť, že protilátky podľa vynálezu majú použitie vo vyvolaní imunosupresie znamená, že môžu byť užitočné pri liečení lebo prevencii odporu ku - alebo odmietnutia transplantovaných orgánov alebo tkaní (napr. obličiek, srdca pľúc, kostnej drene, kože, nechtov, atď.); liečení alebo prevencii autoimúnnych, zápalových, proliferčných a hyperproliferčných ochorení, a kožných prejavov imunologicky medikovaných chorôb (ako napr. reumatoídna artritída, lupus erythematosus, systémový lupus erythematosus, Hashimotova thyroitída, skleróza multiplex,

myasthenia gravis, diabetes typu 1, uveitis, nefrotický syndróm, atopické dermatitídy, kontaktné dermatitídy a iné ekzémové dermatitídy, seborrheické dermatitídy, Lichen planus, Pemphigus, bulózný pemphigus, Epidermolysis bullosa, urticaria, angioedémy, vaskulitídy, erytémy, kožná eozinofiliáza, Alopecia areata, atď.); liečenie reverzibilných obštrukčných dýchacích ochorení, črevných zápalov a alergií (napr. Coeliacova choroba, proctitis, eosinophilia gastroenteritis, mastocytóza, Crohnova choroba a ulceratívna kolitída) a alimentárnych alergií (napr. migréna, rhinitis a ekzémy).

Kdo je zbehlý v obore bude schopný, rutínnym experimentovaním, stanoviť, čo je účinné, netoxické množstvo protilátky na účel navodenia imunosupresie. Obecne však účinné dávkovanie bude v rozmedzí asi 0.05 až 100 miligramov na kilogram telesnej váhy na deň.

Protilátky (lebo ich fragmenty) podľa vynálezu by mali byť užitočné aj na liečbu nádorov v cicavcoch. Konkrétnejšie: Mali by byť užitočné na zmenšenie veľkosti nádoru, inhibíciu rastu nádoru lebo predĺženie času prežitia živočícha s nádorom. Takto sa tento vynález týka spôsobov liečby nádorov v človekovi lebo inom živočíchovi podávaním účinného, netoxického množstva protilátky takémuto človeku lebo zvieratu. Kdo je zbehlý v obore bude schopný, rutínnym experimentovaním, stanoviť, čo je účinné, netoxické množstvo protilátky na účel liečby karcinogénnych nádorov. Obecne sa však účinné dávkovanie očakáva v rozmedzí asi 0.05 až 100 miligramov na kilogram telesnej váhy na deň.

Protilátky podľa vynálezu môžu byť podávané človekovi lebo inému živočíchovi v súlade so skôr spomínanými spôsobmi liečby v množstve postačujúcom vykázať taký účinok do terapeutického lebo profylaktického stupňa. Takéto protilátky podľa vynálezu môžu byť podávané takémuto človekovi lebo inému živočíchovi v konvenčnej dávkovacej forme, spojením protilátky podľa vynálezu s konvenčným farmaceuticky prijateľným nosičom podľa známych

technik. Kdo je zbehlý v obore rozpozná, že forma a charakter farmaceuticky prijateľného nosiča alebo riedidla je diktovaná množstvom aktívnej ingrediencie, s ktorou sa má spojovať, cestou podávania a inými dobre známymi variabilnými veličinami.

Cesta podávania protilátky (lebo jej fragmentu) podľa vynálezu môže byť orálna, parenterálna, inhalačná lebo miestna. Výraz "parenterálny" ako je tu používaný znamená vnútrožilové, vnútro svalové, podkožné, rektálne, vaginálne a intraperitoneálne podávanie. Obecne sa preferujú podkožné a vnútro svalové formy parentrálneho podávania.

Denný režim parentrálnych lebo orálnych dávok na použitie látok podľa vynálezu na profylaktické lebo terapeutické navodenie imunosupresie, alebo na terapeutické pôsobenie na karcinogénne nádory bude obecne v rozmedzí asi 0.05 až 100, ale s výhodou asi 0.5 až 10 miligramov na kilogram telesnej váhy na deň.

Protilátka podľa vynálezu môže byť podávaná inhalačne. "Inhaláciou" sa rozumie intranasálne alebo orálne inhalačné podávanie. Vhodné dávkovacie formy pre takéto podávanie, ako sú aerosólové prípravky lebo inhalátory s odmeranou dávkou, sa dajú pripravovať konvenčnými technikami. Výhodné dávkové množstvo látok podľa vynálezu pre používanie bude obecne vnútri rozmedzia asi 10 až 100 miligramov.

Protilátka podľa vynálezu môže byť podávaná aj miestne. Miestnym podávaním sa myslí nesystémové podávanie a zahrnuje aplikáciu protilátky (lebo jej fragmentu), látky podľa vynálezu, externe na epidermis, do dutiny, alebo nakapaním takejto protilátky do ucha, oka a nosu, a kde nedôjde k významnému vstupu do krvného riečišťa. Systémovým podávaním sa myslí orálne, vnútrožilové, intraperitoneálne a vnútro svalové podávanie. Množstvo protilátky potrebné na terapeutické alebo profylaktické účinky sa bude samozrejme meniť s vybranou protilátkou a povahou a závažnosťou stavu, ktorý sa má liečiť a bude nakoniec na voľnom rozhodnutí lekára. Vhodná miestna dávka protilátky podľa vynálezu

bude obecné vnútri rozmedzia asi 1 až 100 miligramov na kilogram telesnej váhy denne.

Prípravky

Aj keď je možné protilátku alebo jej fragment podávať samotné, výhodné je prezentovať ju ako farmakologický prípravok. Aktívna zložka môže predstavovať, pre miestne podávanie, od 0.001 % do 10 % (váha/váha), napr. od 1 % do 2 % prípravku podľa váhy, aj keď môže predstavovať tak vysoký obsah ako 10 % (váha/váha), ale s výhodou nie viac ako 5 % (váha/váha), a ešte výhodnejšie od 0.1 % do 1 % (váha/váha).

Miestne prípravky podľa vynálezu obsahujú aktívnu zložku spolu s jedným alebo viac prijateľnými nosičmi pre ňu a prípadne [optionally] akýmikoľvek inými terapeutickými ingredientami. Nosič musí byť "prijateľný" v takom zmysle, aby bol kompatibilný s inými ingredientami prípravku a nepoškodzoval zdravie príjemcu.

Prostriedky vhodné na miestne podávanie obsahujú tekuté alebo polotekuté prípravky vhodné na prienik kožou na miesto, kde je liečba potrebná, napr. emulzie, krémy, masti alebo pasty, a kvapky vhodné na podávanie do oka, ucha alebo nosu.

Kvapky podľa tohoto vynálezu môžu obsahovať vodné alebo olejové roztoky alebo suspenzie a môžu byť pripravované rozpustením aktívnej zložky vo vhodnom bakteriálnom roztoku baktericidného alebo fungicidného činidla a/alebo akéhokoľvek iného vhodného konzervačného činidla a s výhodou zahrnujú povrchovo aktívne činidlo. Výsledný roztok potom môže byť vyčistený filtráciou, prenesený do vhodnej nádoby, ktorá je potom uzavretá a sterilizovaná autoklávaním alebo držaním pri 95°-100°C po pol hodiny. Alternatívne môže byť roztok sterilizovaný filtráciou a prenesený do nádoby aseptickou technikou. Príkladmi baktericidného alebo fungicidného činidla vhodného na zahrnutie do kvapiek sú fenylmerkurinitrát alebo -acetát (0.002 %), benzalkóniumchlorid (0.01 %) a clorhexidínacetát (0.01 %). Vhodné

rozpúšťadlá pre prípravky olejovitých roztokov zahrnujú glyceról, zriedený alkohol a propylén glykol.

Emulzie podľa tohoto vynálezu zahrnujú také, čo sú vhodné na aplikáciu na kožu lebo do očí. Očná emulzia môže obsahovať sterilný vodný roztok, prípadne obsahujúci baktericíd a môže byť pripravovaná spôsobmi podobnými ako pre prípravu kvapiek. Emulzie a mazania [liniments] na aplikáciu na kožu môžu tiež obsahovať činidlo pôsobiace rýchle schnutie a chladenie kože, ako alkohol lebo acetón, alebo zvlhčovač ako glyceról, alebo olej ako pižmový a arašídový olej.

Krémy, maste a pasty podľa tohoto vynálezu sú tekuté alebo polotekuté prípravky aktívnej zložky na vonkajšie použitie. Môžu sa pripravovať miešaním aktívnej zložky v jemne delenej lebo práškovanej forme, samotnej alebo v roztoku alebo suspenzii vo vodnej alebo nevodnej kvapaline, s pomocou vhodnej inštrumentácie, na masťnom alebo nemasťnom základe. Základ môže obsahovať uhľovodíky, ako tuhé, mäkké lebo tekuté parafíny, glyceról, včelí vosk, kovové mydlá, rastlinný kaučuk, oleje prírodného pôvodu, ako mandľový, kukuričný, arašídový pižmový alebo olivový olej, tuk z vlny alebo jeho deriváty, alebo masťné kyseliny, ako steárovú lebo olejovú kyselinu, spolu s alkoholom, ako je propylén glykol lebo makrogoly. Prípravok môže zahŕňať akékoľvek povrchovo aktívne činidlo, ako aniónické, kationické alebo nejónické povrchovo aktívne, ako sorbitánové estery a ich polyoxyetylénové deriváty. Suspendujúce činidlá, ako prírodné gumeny, celulóзовые deriváty alebo anorganické materiály, ako kremičitá silika, a iné ingrediencie, ako lanolín, môžu byť tiež zahrnuté.

Kto je zbehlý v obore rozpozná, že optimálne množstvo a rozšírenie [spacing] jednotlivých dávkovaní protilátky podľa vynálezu alebo jej fragmentu budú určené povahou a rozsahom stavu, ktorý sa má liečiť, formou, cestou a miestom podávania, a konkrétnym živočíchom, čo sa má liečiť, a že takéto optimá sa dajú určiť konvenčnými technikami. Bude tiež prijaté tým, kto je

zbehlý v obore, že optimálny priebeh liečby, t.j. počet dávok protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu podaný denne po určitý počet dní sa dá zistiť tými, čo sú zbehlí v obore, s použitím konvenčného behu testov určenia liečby.

Bez ďalšieho rozvádzania sa verí, že kto je zbehlý v obore môže, s použitím predošlého popisu, použiť predkladaný vynález v najplnšom rozsahu. Následujúce je preto treba si vykladať ako púhe ilustratívne príklady a žiadnym spôsobom nie ako akékoľvek obmedzenie rozsahu predkladaného vynálezu.

Kapsľový prostriedok

Farmaceutický prostriedok podľa tohoto vynálezu vo forme kapslí je pripravovaný plnením štandardnej dvojdielnej kapsle z tvrdej želatíny 50 miligramami protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu, v práškovej forme, 100 mg laktózy, 32 mg mastku a 8 mg stearátu horečnatého.

Injekčný parenterálny prostriedok

Farmaceutický prostriedok podľa tohoto vynálezu vo forme vhodnej na injekčné podávanie je pripravovaný miešaním 1.5%-nej protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu v 10%-nom (podľa objemov) propylén glykolu a vode. Roztok je sterilizovaný filtráciou.

Mastový prostriedok

Protilátka lebo jej fragment podľa vynálezu 1.0 g.

Biely mäkký parafín 100.0 g.

Protilátka lebo jej fragment podľa vynálezu sú dispergované v malom objeme vehikly, aby sa vytvoril hladký homogénny produkt. Deformovateľné kovové tuby sa potom plnia disperziou.

Miestne krémový prostriedok

Protilátka alebo jej fragment podľa vynálezu 1.0 g.

Polawax GP 200 20.0 g.

Biely včelí vosk 2.5 g.

Metylhydroxybenzoát 0.1 g.

Destilovaná voda do 100.0 g.

Polawax, včelí vosk a lanolín sa spolu zahrievajú pri 60°C.

Pridá sa roztok metylhydroxybenzoátu a homogenizácia sa dosiahne miešaním pri vysokých obrátkach. Teplota sa potom nechá klesnúť na 50°C. Potom sa pridá protilátka alebo jej fragment podľa vynálezu a rozdisperguje, a prostriedok sa nechá vychladnúť pri pomalom miešaní.

Miestne emulzný prostriedok

Protilátka alebo jej fragment podľa vynálezu 1.0 g.

Sorbitan monolaurát 0.6 g.

Polysorbate 20 0.6 g.

Cetostearyl alkohol 1.2 g.

Glycerín 6.0 g.

Metylhydroxybenzoát 0.2 g.

Čistená voda B.P. do 100.0 ml. (B.P. = British Pharmacopeia)

Metylhydroxybenzoát a glycerín sa rozpustia v 70 ml vody pri 75°C. Sorbitan monolaurát, Polysorbate 20 a cetostearyl alkohol sa roztavia spolu pri 75°C a pridajú do vodného roztoku. Výsledná emulzia sa homogenizuje, nechá chladnúť s trvalým miešaním a protilátka alebo jej fragment podľa vynálezu sa pridajú ako suspenzia vo zvyšujúcej vode. Celá suspenzia sa mieša dokiaľ nie je homogenizovaná.

Prostriedok očných kvapiek

Protilátka alebo jej fragment podľa vynálezu 0.5 g.

Metylhydroxybenzoát 0.01 g.

Propylhydroxybenzoát 0.04 g.

Čistená voda B.P. do 100.0 ml.

Metyl- a propylhydroxybenzoát sa rozpustia v 70 ml čistenej vody pri 75°C a výsledný roztok sa nechá vychladnúť. Protilátka lebo jej fragment podľa vynálezu sa potom pridajú, roztok sa sterilizuje filtráciou cez membránový filter (0.022 µm rozmer pórov) a balí asepticky do vhodných sterilných nádobiek [containers].

Prostriedok na inhalačné podávanie

Na aerosolovú nádobku s obsahom 15-20 ml: Zmiešaj 10 mg protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu s 0.2-0.5% lubrikačným činidlom, ako je polysorbát 85 lebo olejová kyselina, a disperguj takúto zmes s propelantom, ako je freón, s výhodou v kombinácii s (1,2 dichlórtetrafluóroetánom) a difluórochlórometánom a daj do vhodnej aerosolovej nádoby usporobenej na intranasálne lebo ústne inhalačné podávanie.

Prostriedok na inhalačné podávanie

Na aerosolovú nádobku s obsahom 15-20 ml: Rozpusti 10 mg protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu v etanole (6-8 ml), pridaj 0.1-0.2% lubrikačné činidlo, ako je polysorbát 85 lebo olejová kyselina, a disperguj toto v propelante, ako je freón, s výhodou v kombinácii s (1,2 dichlórtetrafluóroetánom) a difluórochlórometánom a daj do vhodnej aerosolovej nádoby usporobenej na intranasálne lebo ústne inhalačné podávanie. parenterálna, inhalačná lebo miestna.

Protilátky lebo ich fragmenty podľa vynálezu sú osobitne užitočné na parenterálne podávanie, t.j. podkožné, vnútro svalové a vnútrožilové. Prostriedky pre parenterálne podávanie budú bežne obsahovať roztok protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu lebo ich koktajl v prijateľnom nosiči, s výhodou vo vodnom nosiči. Dá sa použiť rad vodných nosičov, napr. voda, pufrovaná voda, 0.4% soľný roztok, 0.3% glycín a podobne. Tieto roztoky sú

sterilné a v podstate bez časticového materiálu. Tieto roztoky môžu byť sterilizované konvenčnými, dobre známymi technikami. Prostriedky môžu obsahovať farmaceuticky prijateľné dodatočné substancie ako je potrebné na priblíženie sa k fyziologickým pomerom, ako sú činidlá na nastavenie pH a pufrovanie atď. Koncentrácia protilátky alebo jej fragmentu podľa vynálezu v takýchto farmakologických prípravkoch sa môže meniť v širokom rozmedzí, napr. od menšej ako 0.5%, obyčajne lebo prinajmenšom 1%, do tak vysokej ako je 15% lebo 20% podľa váhy, a bude vybraná primárne na základe objemu tekutiny, viskozít atď., podľa konkrétneho spôsobu vybraného podávania.

Takto farmaceutický prostriedok podľa vynálezu na vnútro svalovú injekciu sa dá pripraviť tak, aby obsahoval 1 ml sterilnej vody a 50 mg protilátky lebo jej fragmentu podľa vynálezu. Podobne farmaceutický prostriedok podľa vynálezu na vnútro svalovú injekciu sa dá pripraviť tak, aby obsahoval 250 ml sterilného Ringerovho roztoku a 150 mg protilátky alebo jej fragmentu podľa vynálezu. Praktické spôsoby na prípravu parenterálne podávateľných prostriedkov sú dobre známe lebo budú jasné tým, čo sú zbehlí v obore, a sú popísané podrobnejšie napríklad v Remington's Pharmaceutical Science, 15-te vydanie, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, zahrnutom tu takto odkazom.

Protilátky (lebo ich fragmenty) podľa vynálezu môžu byť lyofilizované na skladovanie a rekonštituované vo vhodnom nosiči pred použitím. Táto technika sa ukázala ako účinná s konvenčnými imunoglobulínmi a lyofilizačné a rekonštitučné techniky v obore známe sa dajú používať.

V závislosti na požadovaných výsledkoch, farmaceutický prostriedok podľa vynálezu môže byť podávaný na profylaktické alebo terapeutické pôsobenie. V terapeutických aplikáciách je prostriedok podávaný pacientovi už trpiacemu chorobou, v množstve postačujúcom na vyliečenie lebo prinajmenšom na čiastočné

obmedzenie choroby a jej komplikácií. Pri profylaktickej aplikácii prostriedky obsahujúce predkladané protilátky alebo ich koktajl sú podávané pacientovi, ktorý ešte nie je v chorobnom stave na posilenie pacientovej odolnosti.

Malo by sa tiež pripomenúť, že protilátky podľa tohoto vynálezu sa môžu použiť tiež na návrh [design] a syntézu buď peptidových alebo nepeptidových zlúčenín (mimetík), čo by boli užitočné v rovnakej terapii ako protilátky. *Pozri napr. Saragovi et al., Science, 253, 792-795 (1991).*

Uloženie

Kmeň _____ je uložený s ATCC a má pridelené číslo _____. Toto uloženie sa vykonalo 9. júla 1992.

Žiadateľ a jeho spoločníci [assignees] oznamujú svoju zodpovednosť za náhradu týchto kultúr ak vyhynú pred koncom obdobia p tentu na ne vydaného, 5 rokov po poslednej žiadosti o kultúru, lebo 30 rokov, čokoľvek potrvá dlhšie, a zodpovednosť upozorniť depozitár na vydanie takéhoto patentu, pričom v tomto čase sa depozit stane neodvolateľne prístupný verejnosti. Do tohoto času sa stane dostupným pre Commissioner of Patents podľa podmienok 37 C.F.R článkov 1-14 a 35 U.S.C. článku 112.

Ďalšie prevedenia sú v rámci nasledujúcich nárokov.

(1) OBECNÉ INFORMÁCIE:

(i) ŽIADATELIA: ROLAND A. NEWMAN
NABIL HANNA
RONALD W. RAAB

(ii) NÁZOV VYNÁLEZU: REKOMBINANTNÉ PROTILÁTKY NA HUMÁNNU TERAPIU

(iii) POČET SEKVENCIÍ: 16

(iv) KORESPONDENČNÁ ADRESA:

(A) ADRESÁT: Lyon & Lyon
(B) ULICA: 611 West Sixth Street
(C) MESTO: Los Angeles
(D) ŠTÁT: California
(E) ZEM: USA
(F) POŠTOVNÉ SMEROVACIE ČÍSLO: 02111-2658

(v) POČÍTAČOVÁ ČÍTACIA FORMA:

(A) TYP MÉDIA: DISKETA 3,5", 1,44 Mb
(B) POČÍTAČ: IBM kompatibilný
(C) OPERAČNÝ SYSTÉM: IBM P.C. DOS (Verzia 5.0)
(D) POČÍTAČOVÝ PROGRAM (SOFTWARE): WordPerfect
(Verzia 5.0)

(vi) ÚDAJE O SÚČASNEJ PRIHLÁŠKE:

(A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY:
(B) DATUM PODANIA:
(C) KLASIFIKÁCIA:

(vii) ÚDAJE O PREDCHÁDZAJÚCEJ PRIHLÁŠKE:

Celkový počet prihlášok
vrátane prihlášky
popísanej nižšie: 2

(A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY: 07/856 281

(B) DÁTUM PODANIA: 23. MARCA 1992

(A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY: 07/735 064

(B) DÁTUM PODANIA: 23. JÚLA 1991

(viii) INFORMÁCIA O ZÁSTUPCOVI:

(A) MENO: Warburg, Richard J.

(B) ČÍSLO REGISTRÁCIE: 32 327

(C) ODKAZ/ČÍSLO SPISU: 198/158

(ix) INFORMÁCIA O SPOJENÍ:

(A) TELEFÓN: (213) 489-1600

(B) FAX: (213) 955-0440

(C) TELEX: 67-3510

(2) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 1:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 17

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 1:

CCATGGACTG GACCTGG

(3) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 2:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚŽKA: 20

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 2:

ATGGACATAC TTTGTTCCAC

20

(4) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 3:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚŽKA: 20

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 3:

CCATGGAGTT TGGGCTGAGC

20

(5) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 4:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚŽKA: 20

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 4:

ATGAAACACC TGTGGTTCTT

20

(6) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 5:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 20

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 5:

ATGGGGTCAA CCGCCATCCT

20

(7) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 6:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 20

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 2:

ATGTCTGTCT CCTTCCTCAT

20

(8) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 7:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

- (A) DĚŽKA: 16
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová
- (D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Ć: 7:

TTGGGGCGGA TGCACT

16

(9) INFORMÁCIA O SEKV ID Ć: 8:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

- (A) DĚŽKA: 17
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová
- (D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Ć: 8:

GATGGGCCC TTGGTGGA

17

(10) INFORMÁCIA O SEKV ID Ć: 9:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

- (A) DĚŽKA: 21
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová
- (D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Ć: 9:

GATGACCCAG TCTCCAGCCTC
K

21

(11) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 10:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

- (A) DĚŽKA: 21
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová
- (D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 10

CTCACTTGCT GCACAGGTCC

21

Y VR M

(12) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 11:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

- (A) DĚŽKA: 19
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová
- (D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 11:

AAGACAGATG GTGCAGCCA

19

(13) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 12:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

- (A) DĚŽKA: 20
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová
- (D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 12:

GGAACAGAGT GACCGAGGGG

20

(14) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 13:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚŽKA: 31

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 13:

ACTAAGTCGA CATGAAACAC CTGTGGTTCT T

31

(15) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 14:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚŽKA: 39

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 14:

ATCACAGATC TCTCACCATG ACCTGCTCCC CTCTCCTCC

39

(16) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 15:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚŽKA: 423

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 15:

GAC ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA	48
TGG GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG GCG GGC CCA GGA CTG GTG	96
AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC	144
ATC AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG	192
GGA CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT	240
TAC AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC	288
AAG AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACC	336
GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA	384
TTA TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	423

(17) INFORMÁCIA O SEKV ID Č: 16:

(i) VLASTNOSTI SEKVENCIE:

(A) DĚLKA: 387

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) TYP VLÁKNA: Jednovláknová

(D) TOPOLOGIA: Lineárna

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEKV ID Č: 16:

ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA	48
GAC TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG	96
TCC CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA	144
AGG AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG	192
CTG GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA	240
TTC TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG	288
GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT	336
ACT GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA	384
GGT	387

Patentové nároky

1. Rekombinantná protilátka o b s a h u j ú c a konštantnú oblasť imunoglobulínu človeka, šimpanza alebo prvej opice Starého sveta a antigén-viažúcu časť variabilnej oblasti imunoglobulínu druhej opice Starého sveta, kde zmienená prvá a druhá opica Starého sveta môžu byť rovnaké alebo odlišné.

2. Rekombinantná protilátka o b s a h u j ú c a imunoglobulínový ťažký lebo ľahký reťazec so špecifitou na konkrétny známy antigén a s konštantnou oblasťou homológnu ku konštantnej oblasti protilátky človeka, šimpanza alebo prvej opice Starého sveta,

oblasť základnej štruktúry [framework] homológnu k oblasti základnej štruktúry človeka, šimpanza lebo druhej opice Starého sveta,

antigén-viažúcu časť homológnu k antigén-viažúcej časti tretej opice Starého sveta, kde zmienená prvá, druhá a tretia opica Starého sveta môžu byť rovnaké alebo odlišné.

3. Rekombinantná protilátka o b s a h u j ú c a imunoglobulínovú konštantnú oblasť ktorá nie je imunogénna k človeku, oblasť základnej štruktúry [framework] je v podstate neimunogénna k človeku a antigén-viažúcu časť variabilnej oblasti imunoglobulínu prvej opice Starého sveta.

4. Protilátka podľa nároku 1, 2 lebo 3 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudskému antigénu.

5. Protilátka podľa nároku 3 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená konštantná oblasť je homológna s konštantnou oblasťou imunoglobulínu človeka, šimpanza lebo

druhej opice Starého sveta, kde zmienená prvá a druhá opica Starého sveta môžu byť rovnaké lebo odlišné.

6. Protilátka podľa nároku 3 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená oblasť základnej štruktúry je homológna s oblasťou základnej štruktúry človeka, šimpanza lebo opice Starého sveta,

7. Protilátka podľa nároku 1, 2 lebo 3 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že jedna zmienená opica Starého sveta je opica Rhesus.

8. Protilátka podľa nároku 1, 2 lebo 3 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že jedna zmienená opica Starého sveta je opica cynomolgus.

9. Protilátka podľa nároku 1, 2 lebo 3 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že jedna zmienená opica Starého sveta je baboon.

10. Rekombinantná protilátka o b s a h u j ú c a konštantnú oblasť imunoglobulínu prvej opice Starého sveta a druhú antigén-viažúcu časť variabilnej oblasti imunoglobulínu odlišnej opice Starého sveta.

11. Protilátka podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudskému antigénu.

12. Protilátka podľa nároku 1, 2, 3, 5, 6, 10 lebo 11, v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudským antigénom vybraným z CD58, VCAM, VLA4 CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44,

CD54, TNF α , TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGF α , TGF α receptoru, PTGF a CD71.

13. Protilátka podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudským antigénom vybraným z CD58, VCAM, VLA4 CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGF α , TGF α receptoru, PTGF a CD71.

14. Protilátka podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudským antigénom vybraným z CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGF α , TGF α receptoru, PTGF a CD71.

15. Protilátka podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudským antigénom vybraným z CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGF α , TGF α receptoru, PTGF a CD71.

16. Protilátka podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudským antigénom vybraným z CD58, VLA4 CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a,

CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGFalfa, TGFalfa receptoru, PTGF a CD71.

17. Protilátka podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že každá zmienená opica Starého sveta je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z opíc baboon, Rhesus a cynomolgus.

18. Protilátka podľa nároku 1, 2 lebo 3 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená antigén-viažúca časť obsahuje jednu lebo viac CDR oblastí variabilnej oblasti opice Starého sveta.

19. Protilátka podľa nároku 1, 2 lebo 3 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená antigén-viažúca časť obsahuje celú variabilnú oblasť opice Starého sveta.

20. Nukleová kyselina v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že kóduje rekombinantnú protilátku obsahujúcu antigén-viažúcu časť imunoglobulínu prvej opice Starého sveta.

21. Nukleová kyselina podľa nároku 20 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená rekombinantná protilátka obsahuje konštantnú oblasť človeka, šimpanza lebo druhej opice Starého sveta, kde zmienená prvá a druhá opica Starého sveta môžu byť rovnaké lebo odlišné.

22. Nukleová kyselina podľa nároku 21 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená rekombinantná protilátka obsahuje oblasť základnej štruktúry protilátky druhej opice Starého sveta, človeka lebo šimpanza, kde zmienená prvá a druhá opica Starého sveta môžu byť rovnaké lebo odlišné.

23. Nukleová kyselina podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená antigén-viažúca časť obsahuje celú variabilnú oblasť protilátky opice Starého sveta.

24. Nukleová kyselina podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená antigén-viažúca časť obsahuje jednu lebo viac CDR oblastí variabilnej oblasti zmienenej opice Starého sveta.

25. Nukleová kyselina podľa nároku 20, 21 lebo 22, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená prvá a druhá opica Starého sveta sú separátne vybrané zo skupiny pozostávajúcej z opíc baboon, Rhesus a cynomolgus.

26. Monoklonálna protilátka, alebo jej Fab lebo Fv alebo (Fab)₂ fragment, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že je tvorená imortalizovanou B-bunkou opice Starého sveta.

27. Monoklonálna protilátka podľa nároku 26 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená B-bunka je B-bunka opice cynomolgus.

28. Monoklonálna protilátka podľa nároku 26 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená B-bunka je B-bunka opice Rhesus.

29. Monoklonálna protilátka podľa nároku 26 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená B-bunka je B-bunka opice baboon.

30. Monoklonálna protilátka podľa nároku 26, 27, 28 lebo 29 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zmienená protilátka sa

tvorí k ľudskému antigénu.

31. Monoklonálna protilátka podľa nároku 26, 27, 28 lebo 29 v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže k ľudským antigénom vybraným z CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNFalfa, TNF β , Tn antigén, IL-1, IL-8, receptor ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGFalfa, TGFalfa receptoru, PTGF a CD71.

32. Spôsob izolácie variabilnej oblasti génu pre protilátku opice Starého sveta v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zahrnuje kroky:

spojenia [contacting] nukleovej kyseliny z opice Starého sveta a primeru komplementárneho k sekvencii nukleovej kyseliny, ktorá kóduje 5' vedúcu [leader] sekvenciu zmieneného génu pre protilátku, na vytvorenie hybridného komplexu; a

amplifikácie zmienenej nukleovej kyseliny a zmieneného hybridného komplexu na vytvorenie amplifikovanej nukleovej kyseliny.

33. Spôsob podľa nároku 32 v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienená nukleová kyselina je DNA lebo cDNA.

34. Spôsob podľa nároku 32 v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienený primer je komplementárny k nekódujúcemu vláknu sekvencie 5' vedúcej sekvencie génu pre protilátku človeka lebo opice Starého sveta.

35. Spôsob podľa nároku 32 v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienený amplifikačný krok produkuje dostatok nukleovej kyseliny na zavedenie do vektoru.

36. Spôsob izolácie variabilnej oblasti génu pre protilátku opice Starého sveta v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahrnuje kroky:

spojenia [contacting] RNA z opice Starého sveta a reverznej transkriptázy na vytvorenie cDNA,

spojenia zmienenej cDNA a primeru komplementárneho k cDNA v mieste 5' vedúcej sekvencie zmieneného génu pre protilátku, na vytvorenie hybridného komplexu; a

amplifikácie zmienenej nukleovej kyseliny a zmieneného hybridného komplexu na vytvorenie amplifikovanej nukleovej kyseliny.

37. Spôsob na produkciu rekombinantnej protilátky k ľudskému antigénu, pričom zmienená protilátka nie je imunogénna v človekovi, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahrnuje kroky:

vybudenia [raising] protilátky opice Starého sveta ku zmienenému antigénu v opici Starého sveta,

izolácie nukleovej kyseliny opice Starého sveta kódujúcej antigén-viažúcu časť variabilnej oblasti zmienenej protilátky opice Starého sveta,

poskytnutia ľudskej nukleovej kyseliny kódujúcej ľudskú konštantnú oblasť ľudskej protilátky,

ligácie zmienenej nukleovej kyseliny opice Starého sveta a zmienenej ľudskej nukleovej kyseliny na vytvorenie rekombinantnej nukleovej kyseliny, a

expresie zmienenej nukleovej kyseliny na produkciu zmienenej rekombinantnej protilátky.

38. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienená antigén-viažúca časť obsahuje jednu lebo viac CDR oblastí variabilnej oblasti opice Starého sveta.

39. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienená antigén-viažúca časť obsahuje celú variabilnú oblasť opice Starého sveta.

40. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienený spôsob ďalej zahrnuje imortalizáciu bunky schopnej produkovať zmienú protilátku opice Starého sveta.

41. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že ďalej zahrnuje identifikáciu nukleovej kyseliny kódujúcej variabilnú oblasť zmiennej protilátky opice Starého sveta.

42. Spôsob podľa nároku 40, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienená imortalizácia je pomocou hybridómovej fúzie.

43. Spôsob podľa nároku 40, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienená imortalizácia je pomocou vírusovej transformácie.

45. Spôsob podľa nároku 40, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienená imortalizácia je pomocou klónovania jednotlivých B-buniek.

46. Spôsob podľa nároku 40, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienená imortalizácia je pomocou konštrukcie knižnice.

47. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zmienený spôsob ďalej zahrnuje selekciu B-buniek zo zmienenej opice Starého sveta.

48. Spôsob podľa nároku 47, v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienená B-bunka je získaná z lymfocytov periférálnej krvi, z lymfatických uzlín, z kostnej drene lebo zo sleziny.

49. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienený spôsob ďalej zahŕnuje výber [screening] buniek zmienenej opice Starého sveta na produkciu zmienenej protilátky.

50. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienená expresia je v produkčnej bunecnej línii.

51. Spôsob podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienená izolácia zahŕnuje získanie [rescue] génu zmienenej variabilnej oblasti.

52. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 30-44, v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienený antigén je vybraný z CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNFalfa, TNF β , Tn antigénu, IL-1, IL-8, receptoru ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGFalfa, TGFalfa receptoru, PTGF a CD71.

53. Rekombinantná protilátka v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že obsahuje

- (1) konštantnú oblasť ťažkého reťazca ľudskej protilátky;
- (2) konštantnú oblasť ľahkého reťazca zmienenej ľudskej protilátky;
- (3) variabilnú oblasť ťažkého reťazca protilátky opice Starého sveta proti ľudskému antigénu; a
- (4) variabilnú oblasť ľahkého reťazca zmienenej protilátky opice Starého sveta.

54. Rekombinantná nukleová kyselina v y z n a č u j ú c a sa t ý m , že obsahuje prinajmenšom jednu CDR oblasť z variabilných oblastí v SEKV. ID. Č. 15 lebo 16.

55. Farmaceutický prostriedok v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že obsahuje terapeuticky lebo profylakticky účinné množstvo protilátky podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1, 2, 3, 10 lebo 26 vo farmaceuticky prijateľnom nosiči.

56. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 55 v y z n a č u j ú c i sa t ý m , že zmienená protilátka sa špecificky viaže ku CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNFalfa, TNF β , Tn antigénu, IL-1, IL-8, receptoru ľudských T-buniek, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, produktu neu onkogénu, MDR-1, TGFalfa, TGFalfa receptoru, PTGF lebo CD71.

OBR. 1

OPIČIE A ĽUDSKÉ VH VEDÚCE [LEADER] SEKVENCIE

-20 -19 -18 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1

OPIČIE

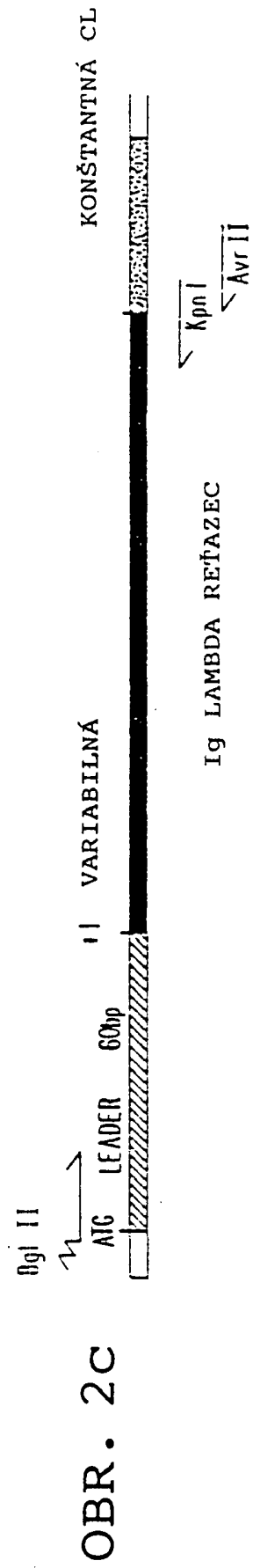
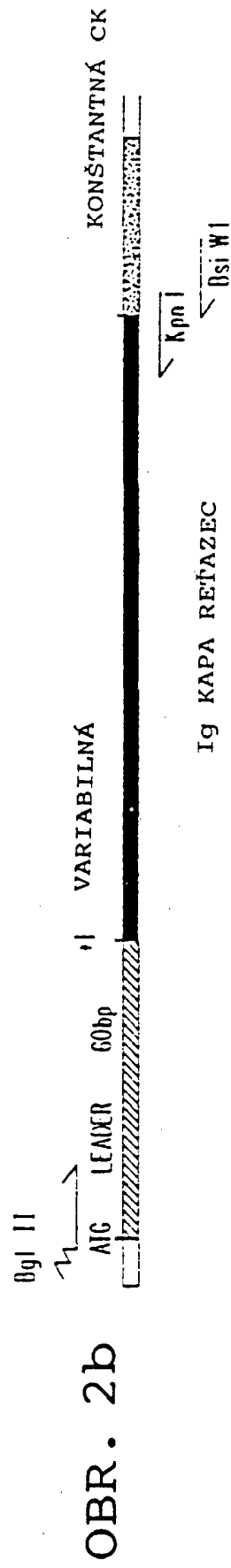
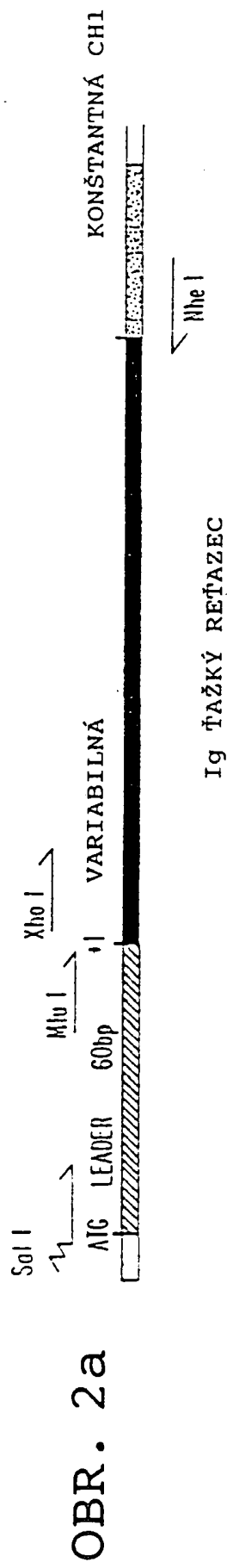
ATG GAC TGG ACC TGG AGG CTC CTC TTT ... GTG GTG GCA GCA GCT ACA GGT GCC AAG TCC	VII1
TGT TCC ACC CTC CTG ... CTG CTG ACC GTC CCG TCC TGG GTT TTG TCC	VII2
TTG ... CTA CTG ACC GTC CCG TCC TGG GTC TTG TCC	"
TGT TCC ACA CTC TTG ... CTA CTG ACC GTC CCG TCC TGG GTC TTG TCC	"
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC ... CTT GTT GCT ATT TTC AAA GGT GTC CAG TGT	VII3
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC ... CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGC GTC CAG TGT	"
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC ... CTT GTT GCT ATT TTA AGA GGC GTC CAG TGT	"
ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC ... CTG GTG GCG GCT CCC AGA TGG GTC CTG TCC	VII4
ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC ... CTG CTG GCA GCT CCC AGA TGG GTC CTG TCC	"
TG GCT GTT CTC CAA GGA GTC TGT TCC	VII5

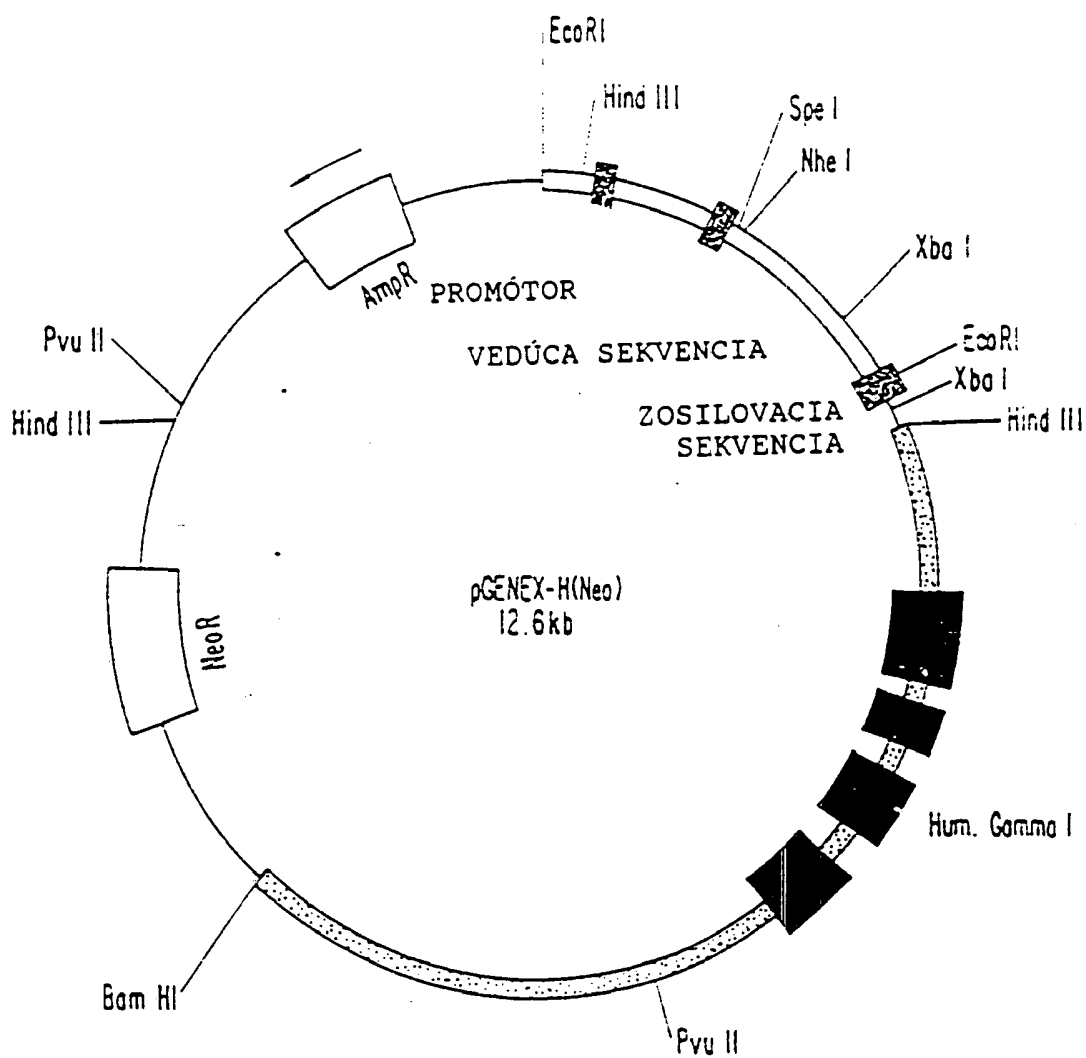
ĽUDSKÉ

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC ... TTG CTG GCT GTA GCA GCC GGT GCC CAC TCC	VII1
ATG GAC TGG ACC TGG ... ATC CTC TTC ... TTG GTG GCA GCA GCG ACG GTC CAC TCC	"
ATG GAC ATA CTT TGT TCC ACC GTC ... CTA CTG ACT GTC CCG TCC TGG GTC TTA TCC	VII2
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC ... CTT GTG GCT ATT TTA AAA GGT GTC CAG TGT	VII3
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC ... CTT GTT GCT ATT TTA AAA GGT GTC CAG TGT	"
ATG GAG CTT GGG CTG ACC TGG GTT TTC ... CTT GTT GCT CTT TTA AAA GGT GTC CAG TGT	"
ATG GAG CTT GGG CTG ACC TGG GTT TTC ... CTT GTT GCT CTT TTA AAA GGT GTC CAG TGT	"
ATG AAA CAC CTG TGG TTC CTC CTC TGG TGG CAG CTC CCA GAT GTG AGG GTC CTG TCC	VII4
ATG AAA CA. CTG TGG TTC TTC CTC ... CTG GTG GCA GCT CCC AGA TGG GTC CTG TCC	"

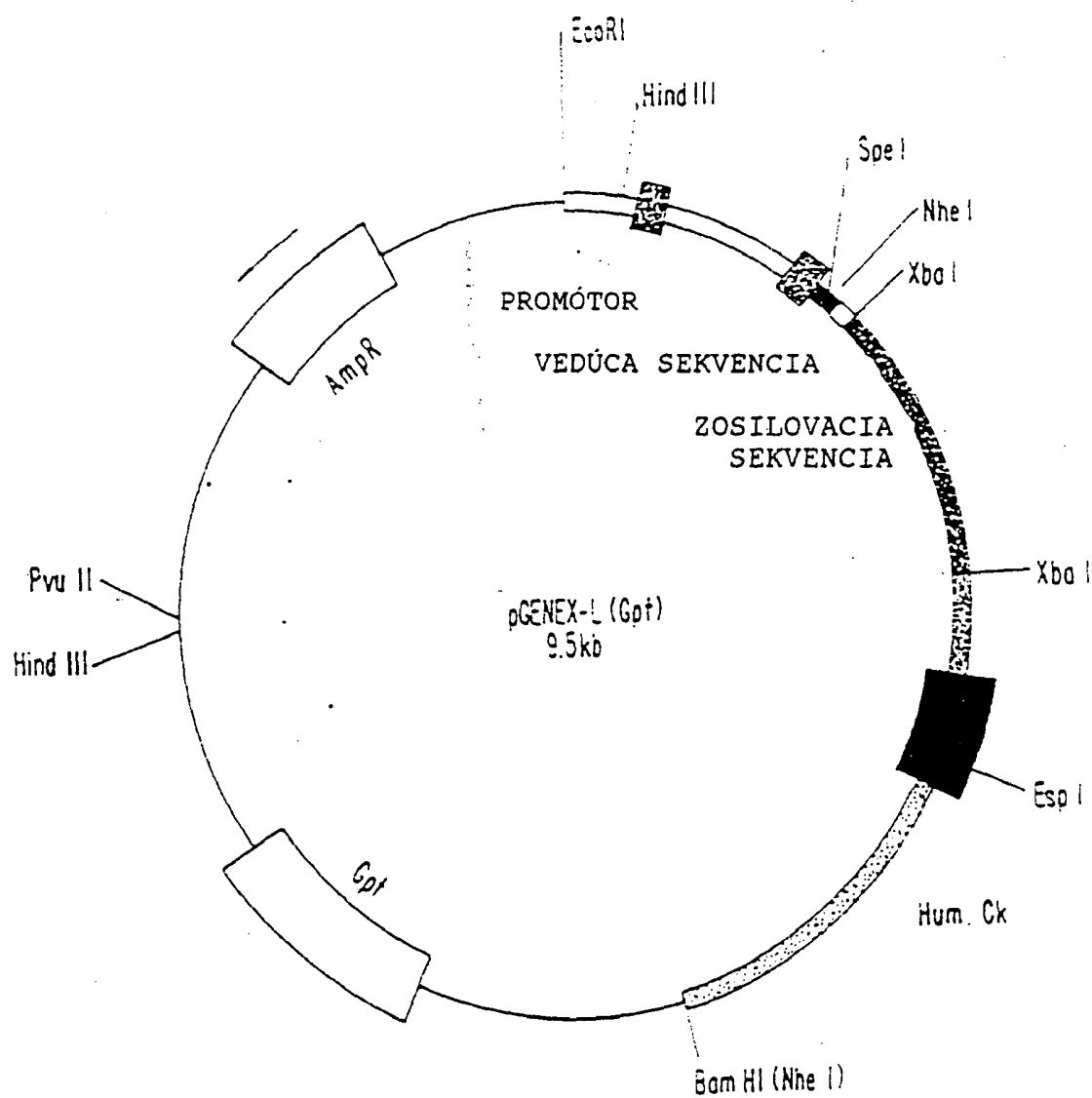
Podčiarknutá = sekvencia primeru

76. 8. 94



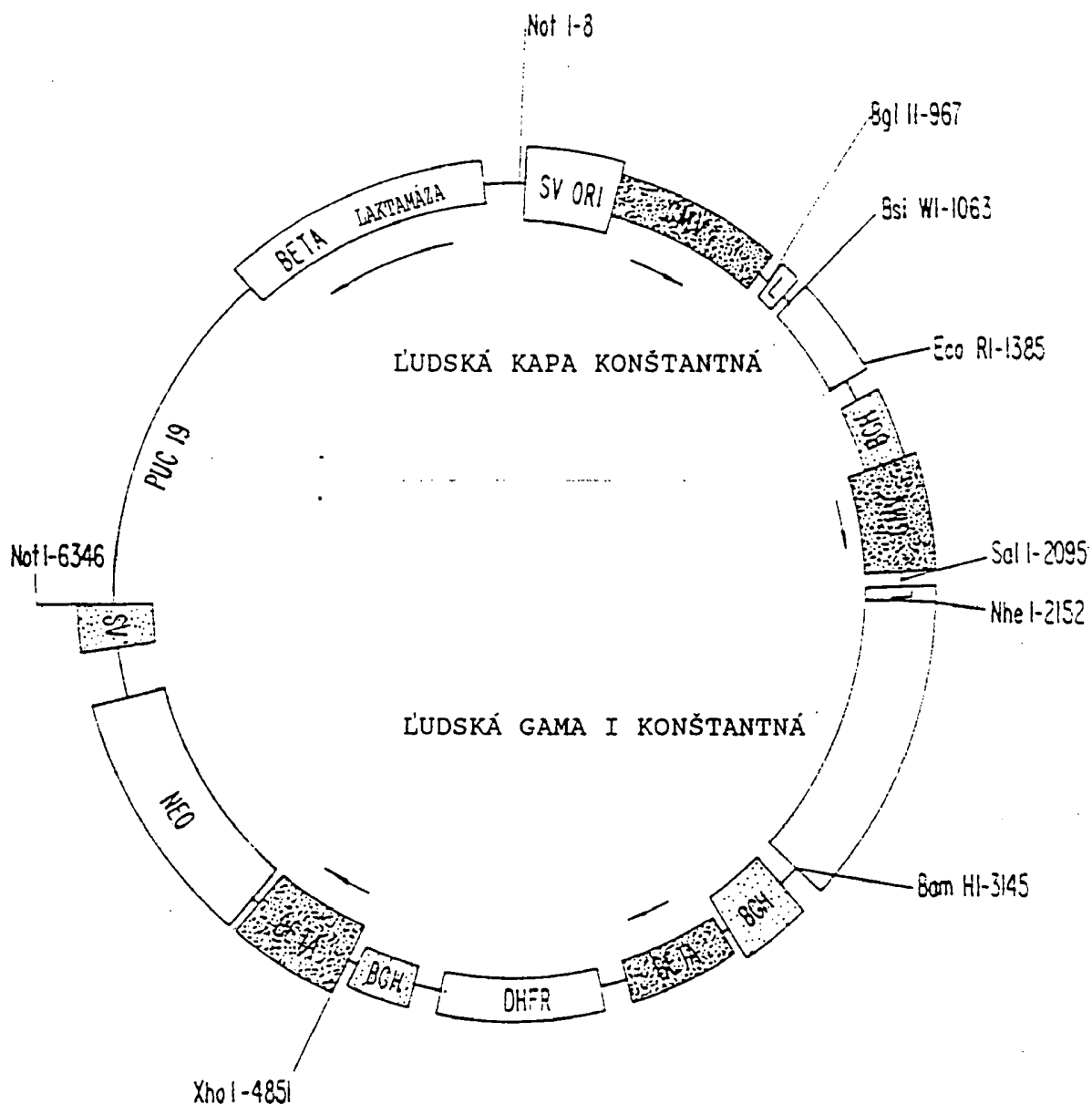


OBR. 3



OBR. 4

OBR. 5

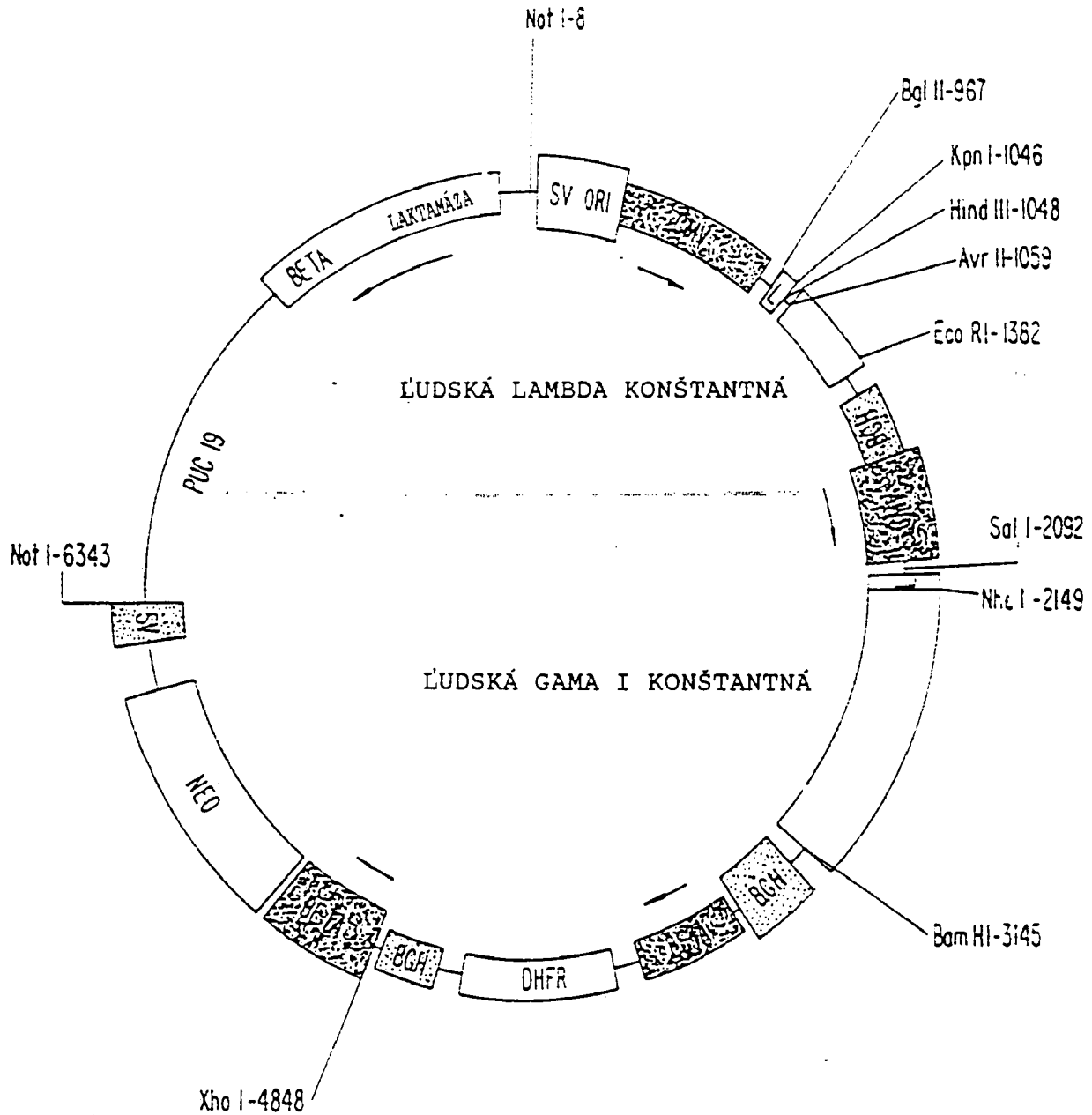


L = VEDÚCA SEKVENCIA [LEADER],
 CMV = CYTOMEGALOVÍRUSOVÝ PROMÓTOR,
 BETA= MYŠACÍ HLAVNÝ BETA GLOBÍNOVÝ
 PROMÓTOR, SV = SV40 POLYADENYLÁCIA
 VČASNÉHO GÉNU, SV ORI = SV40 POČIATOK

TCAE 5.2

OBSAHUJÚCI ĽUDSKÉ IgGI A KAPA KONŠTANTNÉ OBLASTI

OBR. 6



L = VEDÚCA SEKVENCIA [LEADER],
 CMV = CYTOMEGALOVÍRUSOVÝ PROMÓTOR,
 BETA= MYŠACÍ HLAVNÝ BETA GLOBÍNOVÝ
 PROMÓTOR, BGH = POLYADENYLÁCIA BOVINNÉHO
 RASTOVÉHO HORMÓNU,
 SV ORI = SV40 POČIATOK

TCAE 6

OBSAHUJÚCI ĽUDSKÉ IgGI A LAMBDA KONŠTANTNÉ OBLASTI

Primery na amplifikáciu variabilných oblastí ťažkých reťazcov
opičích imunoglobulínov

5' "sense" primery

A. Primery ľudskej lebo opičej včasnej vedúcej sekvencie ťažkého
reťazca s Sali miestom

- V_H1 5' ACTAAGTCGACATGGACTGGACCTGG 3'
V_H2 5' ACTAAGTCGACATGGACATACTTTGTTCCAC 3'
V_H3 5' ACTAAGTCGACATGGAGTTTGGGCTGAGC 3'
V_H4 5' ACTAAGTCGACATGAAACACCTGTGGTTCTT 3'
V_H5 5' ACTAAGTCGACATGGGGTCAACCGCCATCCT 3'
V_H6 5' ACTAAGTCGACATGTCTGTCTCCTTCCTCAT 3'

B. Primery ľudskej lebo opičej neskorej vedúcej sekvencie ťažkého
reťazca s MluI miestom

- V_H1 5' G GCA GCA GC(CT) ACG CGT GCC CAC TCC GAG GT 3'
V_H2 5' G ACC GTC CCG ACG CGT GT(TC) TTG TCC CAG GT 3'
V_H3 5' GCT ATT TTC ACG CGT GTC CAG TGT GAG 3'
V_H4 5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3'
V_H5 5' G GCT GTT CTC ACG CGT GTC TGT GCC GAG GT 3'

C. Primery ľudskej lebo opičej sekvencie základnej štruktúry
[framework] s XhoI miestom

V _H 1,3a,5	+1 CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
V _H 2	+1 CAGGTCAACTTACTCGAGTCTGG
V _H 3b	+1 GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
V _H 4	+1 CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG
V _H 6	+1 CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

3' "anti-sense" primery

A. Primery ľudskej lebo opičej konštantnej oblasti, anti-sense
vlákna s Nhe I miestom

	+118		+110
IgG ₁₋₄	5'	GGC GGA TGC GCT AGC TGA GGA GAC GG 3'	
		Nhe I	

OBR. 7a'

Primery na amplifikáciu variabilných oblastí ľahkých reťazcov
opičích imunoglobulínov

5' "sense" primery

A. Primery ľudskej lebo opičej včasnej vedúcej sekvencie kapa
ľahkého reťazca s BqIII miestom

1. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGTGTTCAGACCCAGGTC 3'
2. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGG(GA)G(AT)CCCC(TA)GC(TG)CAGCT 3'
3. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3'
4. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGACAC(GAC)AGGGCCCCCACTCAG 3'

B. Primery ľudskej lebo opičej včasnej vedúcej sekvencie lambda
ľahkého reťazca s BqIII miestom

1. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCC 3'
2. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCCACTACTTC 3'
3. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTCTCCTCC 3'
4. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGACTCCTCTCTTTC 3'
5. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGACTTGGACCCCACTCCTC 3'

OBR. 7b'

A. Variabilná oblasť ťažkého reťazca

VH1	5'	CCATGGACTGGACCTGG	3'
VH2	5'	ATGGACATACTTTGTTCCAC	3'
VH3	5'	CCATGGAGTTTGGGCTGAGC	3'
VH4	5'	ATGAAACACCTGTGGTTCTT	3'
VH5	5'	ATGGGGTCAACCGCCATCCT	3'
VH6	5'	ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT	3'

B. Konštantná oblasť ťažkého reťazca, anti-sense vlákno

IgM	5'	⁺¹¹⁹ T TGG GGC GGA TGC ⁺¹¹⁵ ACT	3'
IgG ₁₋₄	5'	⁺¹¹⁹ GA TGG GCC CTT GGT ⁺¹¹⁵ GGA	3'

C. Variabilná oblasť ľahkého reťazca

Kapa	5'	⁺⁴ G ATG ACC CAG TCT CCA (G/T)CC ⁺¹⁰ TC	3'
Lambda	5'	⁻⁹ CTC A(C/T)T (T/C)(G/A)C TGC (A/C)CA ⁻³ GGG TCC	3'

D. Konštantná oblasť ľahkého reťazca, anti-sense vlákna

Kapa	5'	⁺¹¹⁵ AA GAC AGA TGG TGC AGC CA ⁺¹¹⁰	3'
Lambda	5'	⁺¹¹⁸ G GAA CAG AGT GAC CGA GGG G ⁺¹¹²	3'

Porovnanie ľudskej konsenzus VH1 sekvencie
s klónovanými opičími variabilnými oblasťami

	S				Q
	A	KL	G		R M
Q	E	RI	T		K V
XVQLVQSGAEVKKPGXSVXVSC	KASGYTFS	<u>DYYTH</u>		WVRQAPGXGLEW	XG
-----	FN-G	<u>NYALS</u>		-----	
---Q-----	T-----	T	<u>SYVIN</u>	-----V---	S-

		T
	M	P
	V	R S TS
	I	LKA FT
<u>XINPSXGYTNYAPXFOG</u>	RVTXTXDXSXNTAYMELSSLRSED	AVYYCAR
<u>WINTDTGNPTYAOGFEKE</u>	---F-M-----	KI-L K-----
<u>WINPSNGNTGYAOKFOG</u>	-----	N-----

	V		
	G		<u>HOMOLÓGIA</u>
<u>XYGFYSNDYXXXXXXXXTXDY</u>	WGQGT	LVTVSS	ĽUDSKÝ VH1 KONSENZUS
<u>VVGTTYAEYFEF</u>	----	A-----	OPIČÍ KLÓN 1-2 88%
<u>MYSWKGT</u>	<u>EDY</u>	-----	OPIČÍ KLÓN 1-14 94%

Porovnanie ľudskej konsenzus VH3 sekvencie
s klónovanými opičími variabilnými oblasťami

	I	S	N		G
	A	V	S		S
					A
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	<u>DYAMH</u>	WVRQAPGKGLEWVX			
-----E-----F-----	<u>TYDMT</u>	-----			
-----	<u>FYSTH</u>	-----Q-----R-----			
-----	<u>SYDMN</u>	-----			
-----S-----	<u>NYNMD</u>	-----S-----			

	MV	S	KT	
	NA	SAF	D EP	L F T
<u>HIEEKXNGSATVYADSVKG</u>	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR			
<u>EISW NSGTLYYASSVKG</u>	-----R-----			
<u>LAGKKADRYKTEYATAVKG</u>	-----S-----T-----			
<u>YISS ASGYIYYADSVKG</u>	-----F-----S-----			
<u>RVIRK GARTKYAASVKG</u>	-----			

HOMOLÓGIA

<u>DPEVESLXXXEXYXXFEEDS</u>	WGQGTILVTVSS	ĽUDSKÝ VH3	KONSENZUS
<u>GTALCSDSGCSS</u>	DV	OPIČÍ KLÓN 3-34	96%
<u>PVLGDRWF</u>	FDL	OPIČÍ KLÓN 3-36	93%
<u>GQPVLOFLEWLLPTTGSDV</u>	--P-V-----	OPIČÍ KLÓN 3-40	95%
<u>DVAAAGT</u>	G---V-----	OPIČÍ KLÓN 3-9	95%

Porovnanie ľudskej konsenzus VH4 sekvencie
s klónovanými opičími variabilnými oblasťami

	T	Y	V		S	R
QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGGSIS				<u>SSYYWS</u>	WIRQPPGKGLEWIG	
-M-----				<u>SSYDWT</u>	-----M-----A	
-----				<u>SGYYWG</u>	----T-----	
--H-----	S			<u>SSGYWG</u>	-----	
-----				<u>GYWG</u>	----T-----	
-----A-----	S			<u>GDYYWE</u>	-----	

	M	P	KK	H	Y	N
<u>YIYY</u> <u>SGSTYYNPSL</u>	KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR					
<u>VISGN</u> <u>SGSADYNPSL</u>	-N-----N-----MT-----I-----					
<u>SLOGR</u> <u>GGNKYLNLSL</u>	-----L-A-----					
<u>SIHGS</u> <u>GGSNSLNPSL</u>	-----L-----G-K-----F-----					
<u>SLOGR</u> <u>GGNKYLNLSL</u>	-----L-A-----					
<u>YIYGS</u> <u>GGGTNYNPSL</u>	NN--S--I-----L-----R-----S					

HOMOLÓGIA

.....			ĽUDSKÝ VH4	KONSENZUS
<u>GDVTSGWYRGY</u>	<u>EDS</u>	WGQGCLVTVSSG	OPIČÍ KLÓN 4-13	90%
<u>VGDNR</u>	<u>EDV</u>	WGPGVLVTVSSG	OPIČÍ KLÓN 4-14	96%
<u>ELYSSSPY</u>	<u>YEDF</u>	WGQGV RVTVSSG	OPIČÍ KLÓN 4-16	92%
<u>GDNR</u>	<u>EDV</u>	WGPGVLVTVSS	OPIČÍ KLÓN SC CHIM	96%
<u>NILKYLHWLLY</u>		WGQGV LVTVSS	OPIČÍ ANTI-CD4 CHIM	88%

Porovnanie ľudskej konsenzus VH5 sekvencie
s klónovanými opičými variabilnými oblasťami

R
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSF TSYWIG WVRQMPGKGLEW
-----G---R-----R---TC-F-- TGFWIS ----V--Q----

MGIIYPGDS DTRYSRSEFGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR..
VGEVSPGDSITRYNPSFGH -----T-TF---N-----Q

HOMOLÓGIA

.....
EAGNGNYVOD

... ĽUDSKÝ VH5 KONSENZUS
FVY WGHGVLVTVSSG OPIČÍ KLÓN 5-11 84%

OBR. 9e.

Porovnanie ľudskej konsenzus VK1 sekvencie
s klónovanými opičími variabilnými oblasťami

V

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>RASOSVXXSDISSYLN</u>	WYQOKP
DIQMTQSPAS-----K-----	<u>RASO</u>	<u>SESSSLA</u> -----
DIQMTQSPAS-----	<u>QASO</u>	<u>SVSNLLA</u> -----
DIQMTQSPAS-----V--	<u>RASO</u>	<u>GINOELS</u> -----
DIQMTQSPAS-----	<u>RASO</u>	<u>GISSYLN</u> -----

R

G

I

GKAPKLLIYXASSLES	GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYC
-----DSASSLOS	-----K-----S---
-----P---KASSLES	-----TR-----N--E-----F---
-----T---AASSLOT	-----S--PE--V--ED-
-----L	

HOMOLÓGIA

<u>QOYNSLPXXYD</u>	<u>YT</u> FGQGTKVEIK	ĽUDSKÝ VK1	KONSENZUS
<u>QOYYSYPR</u>	<u>LT</u> -----	OPIČÍ KLÓN K1-7	94%
<u>QOGNSYP</u>	<u>LT</u> --G-----	OPIČÍ KLÓN K1-3	90%
<u>LODYMSR</u>	<u>WT</u> -----	OPIČÍ KLÓN K1-14	90%

OBR. 9f.

Porovnanie ľudskej konsenzus Lambda VIII sekvencie
s klónovanými opičimi variabilnými oblasťami

			S		
SYELTOPPSVSVSPGQTARITC	<u>SGDALGOKYVY</u>	WYQOKP			
----S--R-----GF--	<u>GGDNVGRKSVQ</u>	-----			
					M
				T G	
			N	AQ E	
GQAPVLVIY	<u>EDSKRPS</u>	GIPERFSGSNSGTTATLTISGVEAXDEADYYC			
P-----	<u>ADSERPS</u>	---A-----			
<u>QAWDSYXXV</u>	FGGGTKLTVLG	ĽUDSKÝ LAMBDA KONSENZUS			
<u>QVWDSTADHWV</u>	-----R-----	OPIČIA ANTI-CD4 91%			

OBR. 9h.

OBR. 10

Porovnanie ľudskej VH3 konsenzus sekvencie so 4 opičími VH3 sekvenciami a 8 ľudskými VH3 sekvenciami

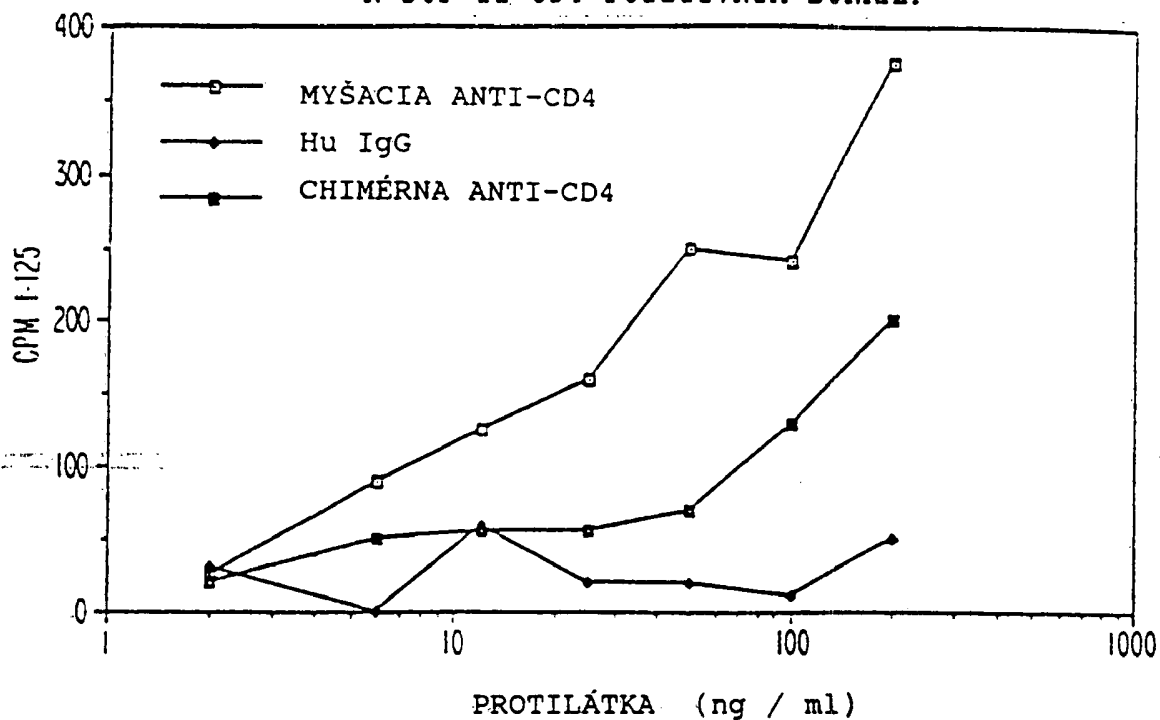
I	S			G							
	V			S							
				A							
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	Q-----V---R-----S--	Q-----V-G--R-----S--	Q-----V---SR-----S--	Q-----L-----V---N--	Q-----R-----N-G	Q-----R-----S--	Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-
Q-----V---R-----S--	Q-----V-G--R-----S--	Q-----V---SR-----S--	Q-----L-----V---N--	Q-----R-----N-G	Q-----R-----S--	Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----V-G--R-----S--	Q-----V---SR-----S--	Q-----L-----V---N--	Q-----R-----N-G	Q-----R-----S--	Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----L-----V---N--	Q-----R-----N-G	Q-----R-----S--	Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----R-----N-G	Q-----R-----S--	Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----R-----S--	Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----D--E-----V--EV--I--	Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----M-----AF-----K-----N--	Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----A-----S--V-----	Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----E-----F-----S--	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	
Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	Q-----X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	

	MV	S	KT	
	NA	SAF	D	EP
				L F T
HIEEKXNGSATYYADSVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR			
VIS YDGSNEYFADSVKG	-----N---MG-----			
VIS DDGSNKYYADSVKG	-----K-----D-----K			
VIS YDGSNKYYADSVKG	-----S-----			
TIS ASGYATYYADSVKG	-I-----A-----N			
SIRSKDYGGTTEYAASVKG	-----SI-----S-			
AISG SGGSTYYADSVKG	-----K			
QIKNKVDGGTIDYAAPVKG	--I-----S-----KI-----VG			
HIENKTKNYATIYRASVKG	-----AF---D---PD---L---P			
YIS SASGYIYYADSVKG	-----FA--S-S--S-----			
RVI RKGARTKYAASVKG	-----S--KT-----			
RIS WNSGTIYYASSVKG	-----R-----			
LAGKKADRYKTEYATAVKG	-----S-----T-----			
RIN XWDDDKYYSTSLRS	-L---K-T---QVV-XXXXDPX---T-----			

DPEVESLXXXFXYYX FFDS	WGQGTTLVTVSS	Hum VH3	
DRVAVYASVFFID SFDI	-----G--	RF TS2	92%
GVCSSSSSCYSYYYYHYMDV	--K--T--	RF SJ1	87%
GRFCSGQSCYSYYYYYMDV	-K--T-----	RF SJ2	91%
NISETL DS	-----	BE	93%
NNTSPY FDY	--E-----	CHERRI	92%
GQVLYYGSGSYHW FDP	-----	18/2	98%
NYTGTV DY	-----	K6H6	84%
PPEVESLRS	--R-----	1S11	93%
GQPVLQFLEWLLPTTGS DV	--P-V-----	opičia #40	92%
DVAAAGT G---V-----		opičia #9	90%
GTALCSDSGCSS DV	-----	opičia #34	95%
PVLGDRWFF DL	-----PI-I--	opičia #36	91%
RXPXXXXGXGXYXXA FDV	-----T-----	Hum VH2	60%

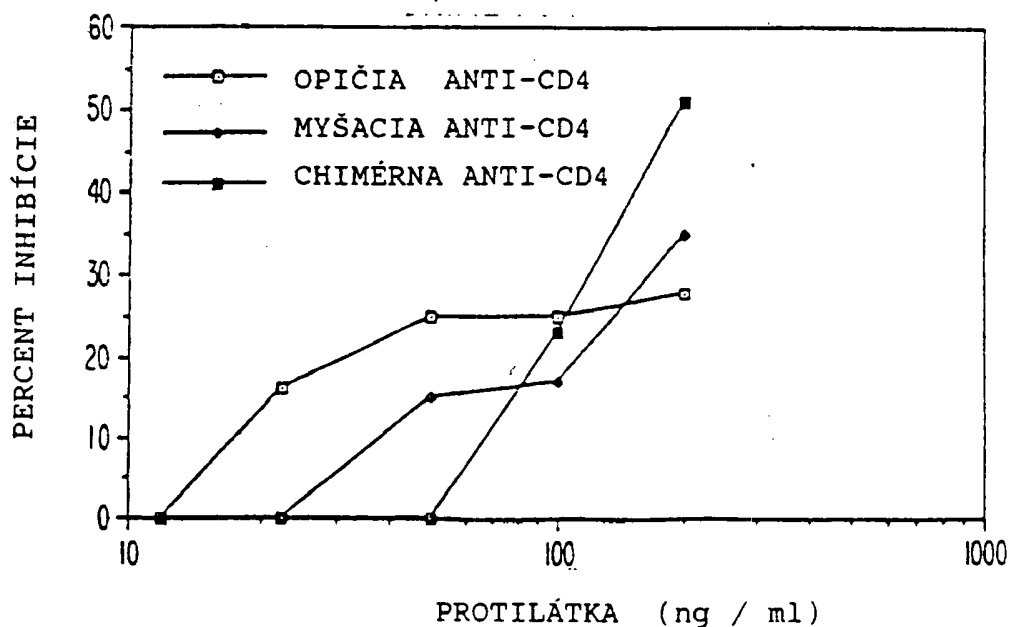
OBR. 11

PRIAMA VÄZBA CHIMÉRNEJ ANTI-CD4 K SUP TI CD4-POZITÍVNYM BUNKÁM



OBR. 12

INHIBÍCIA 1F3 VÄZBY K CD4 POZITÍVNYM BUNKÁM OPIČIOU A OPIČIOU/LUDSKOU CHIMÉRNAU PROTILÁTKOU



OBR. 13

Opičia Anti-CD4 V_H sekvencia. Zaznamenaná od 1 do 420 bp.

Prekladaná od metionínu ATG vedúcej sekvencie (bp 4) do bp 420.

Bielkovinná sekvencia číslovaná od zvyšku +1 základnej štruktúry [framework] do posledného V_H zvyšku, +120

M K H L W F F L L L V A A P R
GAC ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA

+1 10
W V L S Q V Q L Q E A G F G L V
TGG GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG GCG GGC CCA GGA CTG GTG

20
K P S E T L S L T C S V S G G S
AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC

30 40
I S G D Y Y W F W I E Q S P G K
ATC AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG

50 60
G L E W I G Y I Y G S G G G T N
GGA CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT

70
Y N P S L N N R V S I S I D T S
TAC AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC

80 90
K N L F S L K L R S V T A A D T
AAG AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

100
A V Y Y C A S N I L K Y L H W L
GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA

110 120
L Y W G Q G V L V T S S
TTA TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC

OBR. 14

Opičia Anti-CD4 V_{Lambda} sekvencia. Zaznamenaná od 1 do 387 bp.

Prekladaná od metionínu ATG vedúcej sekvencie (bp 4) do bp 387.

Bielkovinná sekvencia číslovaná od zvyšku +1 základnej štruktúry [framework] do posledného V_{Lambda} zvyšku, +109

M A W A L L L L G L L A H F T
ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA

+1 10
D S A A S Y E L S Q P R S V S V
GAC TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG

20
S P G Q T A G F T C G G D N V G
TCC CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA

30 40
R K S V Q W Y Q Q K P P Q A P V
AGG AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG

50 60
L V I Y A D S E R P S G I P A R
CTG GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA

70
F S G S N S G N T A T L T I S G
TTC TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG

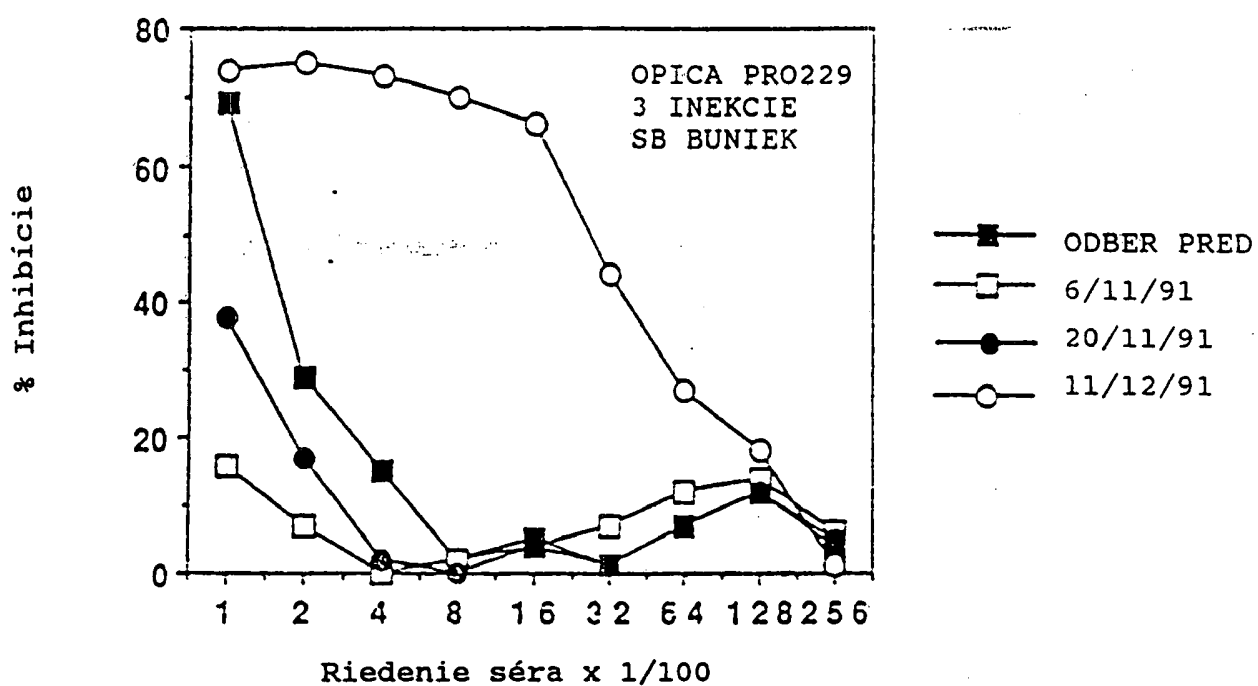
80 90
V E A G D E A D Y Y C Q V W D S
GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT

100
T A D H W V F G G T R L T V L
ACT GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA

109
G
GGT

70 88-44

ANTI-CD54 KOMPETIČNÁ AKTIVITA V B BUNKÁCH
IMUNIZOVANÁ OPICA, INHIBÍCIA 84H10
MAB VÄZBA K ICAM TRANSFEKOVANÝM CHO BUNKÁM



OBR. 15

PL 88-94

OBR. 16

ICAE 5.2 VS. ICAE 12

