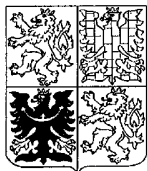


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.05.1999**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.05.1998**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9809951**  
(33) Země priority: **GB**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**  
(Věstník č. 5/2001)  
(86) PCT číslo: **PCT/GB99/01441**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/58572**

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 4146**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

C 07 K 16/00	C 12 N 15/63
C 07 K 19/00	C 12 N 5/10
C 12 N 15/12	A 61 K 39/395
C 12 N 15/62	A 61 P 37/00
C 07 K 16/34	A 61 P 29/00
A 61 K 47/48	
C 07 K 16/28	
C 12 N 15/13	

(71) Přihlašovatel:

CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL  
SERVICES LIMITED, Cambridge, GB;

(72) Původce:

Armour Kathryn Lesley, West Wrating, GB;  
Clark Michael Ronald, Cambridge, GB;  
Williamson Lorna McLeod, Harston, GB;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vazebné molekuly odvozené od imunoglobulinů,  
které nespouští lyzi zprostředkovanou  
komplementem**

(57) Anotace:

Navázání molekul, kterými jsou rekombinantní polypeptidy obsahující i) vazebnou oblast schopnou vázat cílovou molekulu a ii) efektorovou oblast, která vykazuje aminokyselinovou sekvenci v podstatě homologní s celou nebo s částí konstantní oblastí těžkého řetězce lidského imunoglobulinu. Vazebná molekula je schopna vázat cílovou molekulu, aniž spustí podstatnou lyzi závislou na komplementu nebo poškození cíle zprostředkované buňkou. Preferuje se, aby efektorová oblast byla schopna specificky vázat FcRn a/nebo FcγRIIb. Tyto vazebné molekuly jsou obecně založeny na chimérových oblastech, které se získaly ze dvou nebo více oblastí C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu. V preferovaném provedení se oblastí 233 až 236 a 327 až 331 upravily tak, aby propůjčily molekule nulový alotyp. Nukleové kyseliny hostitelské buňky, způsoby produkce, materiály a použití. Farmaceutické prostředky s obsahem těchto sloučenin a jejich použití pro léčení autoimunitních, aloimunitních a zánětlivých onemocnění.

Vazebné molekuly odvozené od imunoglobulinů, které nespouští lyzi zprostředkovanou komplementem.

### Oblast techniky

Vynález popisuje vazebné polypeptidy, které mají aminokyselinové sekvence získané z upravené konstantní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinu G (IgG). Vynález dále popisuje způsoby a materiály vhodné pro produkci takových polypeptidů a metod a používaných materiálů.

### Dosavadní stav techniky

#### Imunoglobuliny

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které pomáhají chránit hostitele před infekcí. V obecném případě obsahují těžký a lehký řetězec, N-terminální oblasti, kterou tvoří variabilní oblast nebo V oblast, jenž jsou schopné vázat antigen. V oblast je spojena s konstantní nebo C-terminální oblastí, která definuje třídu (a někdy podtřídu (izotyp) a alotyp (izoalotyp) imunoglobulinu.

U savčích druhů pak existují imunoglobuliny jako IgD, IgG, IgA, IgM a IgE. Třída IgG u lidí naopak existuje jako 4 podtřídy (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). C-oblast v IgG obsahuje tři domény Cy1, Cy2 a Cy3, které jsou si v rámci těchto podtříd velmi podobné (vykazují přes 90 % homologie). Oblasti Cy1 a Cy2 jsou spojeny kloubním spojením. Úloha podtříd se mění v závislosti na druzích.

Je známo, že C-oblast je odpovědná za různé funkce efektorů imunoglobulinu (popisuje se v publikaci Clark (1997) „IgG Effector Mechanisms“ in „Antibody Engineering“ Ed. Capra, Pub. Chem. Immunol., Basel, Kurger, Vol. 65 pp 88-110).

Funkce IgG se dosáhnou prostřednictvím interakce mezi oblastí Fc imunoglobulinu a receptoru Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) nebo jiné vazebné molekuly, někdy na efektorové buňce. To může způsobit, že buňka efektoru usmrtí cílové buňky, na které jsou navázány protilátky prostřednictvím jejich variabilních oblastí (V). Také protilátky směřované proti rozpustným antigenům mohou tvořit imunitní komplexy, které jsou cíleny do Fc $\gamma$ R, což vede k pohlcení (opsonozaci) imunitních komplexů nebo ke spuštění efektorových buněk a k uvolnění cytokinů.

U lidí se charakterizovaly tři třídy Fc $\gamma$ R, ačkoli se situace dále komplikuje výskytem více forem receptorů. Existují tři třídy:

- i) Fc $\gamma$ RI (CD64) váže monomerní IgG s vysokou afinitou a exprimuje se na makrofágách, monocytech a někdy na neutrofilech a eosinofilech.
- ii) Fc $\gamma$ RII (CD32) se váže na komplex IgG se střední až nízkou afinitou a exprimuje se v širokém měřítku. Tyto receptory se mohou rozdělit do dvou důležitých typů, Fc $\gamma$ RIIa a Fc $\gamma$ RIIb.

Forma receptoru „a“ se nachází na mnoha buňkách a podílí se na usmrcení (například makrofágy, monocyty, neutrofilny) a zdá se, že aktivují proces usmrcení a objevují se jako dvě alternativní alely.

Zdá se, že forma „b“ má důležitou úlohu v inhibičních procesech a nachází se na B-buňkách, makrofágech a na žírných buňkách a eosinofilech. Když se vyskytují na B-buňkách, zdá se, že působí jako supresory produkce dalšího imunoglobulinu a přepínače izotypu například třídy IgE. U makrofágů B-forma působí jako inhibitor fagocytózy, což zprostředkovává RcyRIIa. U eosinofilů a žírných buněk může forma „b“ pomoci potlačit aktivaci těchto buněk prostřednictvím navázání IgE na jeho oddělený receptor.

iii) Fc $\gamma$ RIII (CD16) se váže na IgG se střední až nízkou afinitou a tvoří dva typy. Fc $\gamma$ RIIIa se nachází na buňkách NK, makrofágách, eosinofilech a některých monocitech a T buňkách a zprostředkovává ADCC. Fc $\gamma$ RIII se silně exprimuje na neutrofilech. Oba typy tvoří různé alotypové formy.

Stejně jako navázání na Fc $\gamma$ R protilátky mohou aktivovat komplement a to může vést k lyzi buněk, opsonizaci nebo k uvolnění cytokinů a zánětu. Oblast Fc může také zprostředkovat takové vlastnosti, jako transport IgG novorozenci (prostřednictvím tzv. „FcRn“), zvýšení poločasu rozpadu (věří se, že je také ovlivněn prostřednictvím receptoru typu FcRn (popisuje se v publikaci Ghetie and Ward (1997) Immunology Today 18, 592-598) a samoagregaci. Oblast Fc je také zodpovědná za interakci s proteinem A a proteinem G (tato interakce se jeví být analogem k navázání FcRn).

#### Konstrukce imunoglobulinů

Řada vlastností zprostředkovaných Fc, které se diskutují shora v textu se mohou vyžadovat u přirozeně se vyskytujících nebo uměle konstruovaných protilátek. Mohou však nastat okolnosti, kdy odumírání buněk nebo uvolňování cytokinů a výsledný zánět není žádoucí a není vhodný.

Může být také nutné zachovat jisté funkce zprostředkované Fc. Jsou to například dlouhý poločas rozpadu plazmy.

Je známo, že lidský imunoglobulin IgG4 například neaktivuje komplement a lidské IgG2 se neváže na receptor Fc $\gamma$ RI s vysokou afinitou a na základě těchto poznatků se tyto imunoglobuliny používaly v určitých situacích (fúzní protein receptoru TFN se připravil s IgG4 Fc).

Avšak podtřídy, které nejsou lidské nevykazují žádný z relevantních efektorů Fc, které spouští funkce nebo aktivaci komplementu za všech okolností. Pravděpodobně tyto podtřídy vykazují existenci několika forem receptorů FcγR. Tak například IgG4 může u některých lidí zpustit buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC) a IgG2 se váže na jednu alelovou formu receptoru FcγRIIa a také aktivuje komplement.

Alternativním přístupem je mutace sekvence Fc, přičemž se substituují zbytky, které jsou nutné pro zachování funkce. Jisté cílové zbytky se identifikovaly a publikovaly se v publikaci Clark (1997) „IgG Effector Mechanisms“ in „Antibody Engineering“ Ed. Capra, Pub. Chem. Immunol., Basel, Kurger, Vol. 65 pp 88-110. Tyto zbytky zahrnují sacharidy připojené svým N-koncem ke konzervativnímu místu oblasti C<sub>H</sub>2, jisté zbytky ve spodní oblasti spojení (například sekvence ELLGGp) a prolinový zbytek v poloze 331 a sekvence E-x-K-x-K v polohách 318 až 322. Jeden příklad se popisuje v publikaci Cole et al (1997) Journal of Immunology 159, 3613-3621. V tomto příkladu se zbytky 234, 235 a 237 mutovaly na alaniny (nebo v případě 235 někdy na Glu). Jsou to však všechno neobvyklé zbytky v těchto polohách v lidském IgG, přičemž přítomnost takových nevhodných aminokyselin může tvořit Fc více imunogenní nebo antigenní a může také vést ke ztrátě jistých požadovaných funkcí Fc.

Tato strategie se může také použít při konstrukci terapeutických glykosylovaných protilátek CD3 (popisuje se v publikaci Routledge et al., 1993 Eur J. Immunol. 23: 403-411, patent UK 9206422.9) a inhibičních protilátek CD18. Jednou nevýhodou je, že nové rekombinantní konstrukce vykazují neobvyklé sekvence a mohou být rozeznány a odmítnuty imunitním systémem jako cizorodé. Glykosylované protilátky také nevykazují navázání na inhibiční receptor FcγRIIb, zatímco

udržování schopnosti vázat se může být v některých případech výhodné.

Jiné přístupy k modifikaci imunoglobulinů se popisují v publikaci WO 92/16562 (Lynxvale LTD.). V této publikaci se popisuje úprava alotypu humanizovaných protilátek IgG1 CAMPATH1H, které vykazují vazebnou afinitu pro antigen CD52. Antigen CD52 se nachází na lidských lymfocytech a monocytech a používá se jako terapeutický cíl pro léčbu lymfomů T a B buněk a leukemií, imunosuprese příjemců při transplantaci orgánu nebo kostní dřeně a také při léčbě některých autoimunitních a příbuzných poruch, jako je revmatická artritida a systémová vaskulitida.

Dokument WO 95/05468 (Lynxvale Ltd.) také popisuje modifikaci alotypických determinant v Ig (nebo deriváty), které mají požadované vazebné nebo efektorové funkce.

Na základě předcházejících informací je možné říci, že zavedení metod nebo materiálů, které umožní inženýring oblastí Fc tak, že se redukuje nežádoucí účinky, zatímco se zachovávají nebo zesilují požadované vlastnosti, bude přínosem pro stav techniky.

#### Podstata vynálezu

Vynález popisuje nové kombinace sekvencí lidské podtřídy IgG za účelem vzniku chimérových polypeptidů, které obsahují nepřirozené, lidské napodobující Fc sekvence, které neaktivují komplement nebo nespouští cytotoxické aktivity prostřednictvím FcγR. Ve stejné době jisté požadované vlastnosti IgG zůstaly zachovány. Například polypeptidy neobsahují „nelidské“ aminokyseliny a proto pravděpodobně redukuje imunogenicitu. (dále stále váží protein A, který je schopen zkřížit lidskou placentu prostřednictvím interakce s FcRn (neonatální Fc receptor)).

Způsob, kterým se sekvence budou vyvíjet, a jisté demonstrovatelné vlastnosti se popisují dále v textu. Vynález popisuje řadu konstrukcí založených na třech různých sekvencích IgG (1, 2 a 4). Ačkoli relevantní oblasti těchto protilátek sdílí homologii, neodpovídají délkou, čímž komplikují proces vytvoření odvozených sekvencí, které si ponechávají aktivity z přirozených sekvencí. Konstruované protilátky se porovnaly s rodičovskými kontrolními protilátkami v souladu s modelovými antigenními systémy RhD (Fog1) a CD52 (CAMPATH-1H). Překvapivě se vytvořilo řada sekvencí s požadovanou kombinací aktivit, které se nenacházejí u rodičovských molekul. V obecném případě obsahují jednu nebo více oblastí nebo bloků, které obsahovaly modifikace (obvyčně 2, 3 nebo 4 aminokyseliny), které jsou v souladu s odpovídající oblastí z různých podtříd. Dvě určité oblasti nebo bloky jsou 233 až 236 a 327, 330, 331.

Vynález popisuje molekulu vázající se na polypeptid obsahující i) vazebnou oblast schopnou vázat se na cílovou molekulu a ii) efektorovou oblast, která má aminokyselinovou sekvenci v podstatě homologní s celou nebo s částí konstantní oblasti těžkého řetězce lidského imunoglobulinu. Tato molekula je charakterizována tím, že vazebná molekula je schopna vázat cílovou molekulu, aniž spustí podstatnou lyzi závislou na komplementu nebo destrukci cíle zprostředkovanou buňkou a přednostně tím, že efektorová oblast je schopna se specificky vázat na FcRn nebo na FcγRIIb, přičemž více se upřednostňuje, když se váže jak na FcRn tak na FcγRIIb.

Specifické navázání FcRn se může dokázat schopností se specificky vázat na protein A.

Vazebné molekuly podle vynálezu vykazují zlepšené klinické vlastnosti (například v souladu s „blokujícími“ protilátkami).

Toho se dosáhne připravením efektorové domény odvozené od Fc, která má sníženou afinitu pro FcγRI, FcγRII a FcγRIII, ale která si uchovává schopnost vázat se na protein A (vzhledem k FcRn, možnému neonatálnímu transportu a vysokému poločasu rozpadu) a/nebo FcγRIIb. Tak zbytky odpovědné za navázání FcRn na IgG není třeba modifikovat s ohledem na přirozenou oblast Fc v molekulách podle vynálezu.

V obecném případě snížení afinity, kterou vykazuje oblast efektoru vzhledem k receptoru FcγRI (porovnává se s jednou oblastí Fc, ze které se odvodil), může v preferovaných provedeních vynálezu být stonásobně nebo vyšší. V případě receptorů s nižší afinitou popsaných shora v textu snížení afinity může být nižší například o 2 až 10 násobek, ačkoli ve většině preferovaných provedeních vynálezu může být vyšší než 500 krát. Obecně odpovídající snížení aktivity v testu chemoluminiscence (jak se popisuje dále v textu) může být až 30 až 300 násobně. Snížená aktivita komplementu může dosahovat 50-ti násobku. Odpovídající obrázek v případě ADCC může být daleko vyšší, například 10 000 násobek. Kombinace těchto (omezených) aktivit může být při těchto aplikacích stále výhodná s ohledem na přesnou hodnotu snížení.

Navzdory tomu, že v minulosti se připravily chiméry IgG1/IgG2 a IgG1/IgG4 (popisuje se v publikaci Morgan et al. (1995) Immunology 86: 319-324 nebo Chappel et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 9036-9040 nebo Greenwood et al (1993) Eur. J. Immunol. 23: 1098-1104), žádná z nich nevykazuje kombinaci vlastností, které vykazuje vazebná molekula podle vynálezu.

Různé funkce vazebné molekuly se mohou odhadnout bez velkého úsilí, například za použití metod popsaných dále v textu nebo analogických metod. Například vazebné vlastnosti FcγR FcγRIIb se mohou odhadnout přímo nebo nepřímo, například

prostřednictvím neschopnosti vyvolat chemoluminiscenci u monocytů.

Neschopnost vyvolat podstatnou lyzi závislou na komplementu (která proběhne prostřednictvím snížené afinity v případě molekuly C1q) se může měřit pomocí CR-51 uvolněného z cílových buněk v přítomnosti komponentů komplementu, například ve formě séra (jak se popisuje dále v textu), přičemž vazebné molekuly způsobí méně než 5%, upřednostňuje se méně než 2 % specifickou cílenou buněčnou lyzi.

Podobně, buňkou zprostředkovaná destrukce cíle se může hodnotit pomocí CR-51 uvolněným z cílových buněk v přítomnosti vhodných cytotoxických buněk, jako jsou krevní monojaderné efektorové buňky (jak se popisuje dále v textu), přičemž vazebná molekula způsobuje méně než 5%, upřednostňuje se méně než 2 % specifickou cílenou buněčnou lyzi.

Jako alternativa k přímému měření se funkčnost může odvodit na základě schopnosti inhibovat tyto atributy ve funkčních imunoglobulinech. Tím, že se například poskytne ochranný účinek proti lyzi buněk komplementem nebo usmrcení buněk (například pomocí ADCC) nebo inhibicí odezvy monocytů na citlivé buňky.

V jednom preferovaném provedení podle vynálezu efektorová oblast obsahuje aminokyselinovou sekvenci v podstatě homologní se sekvencí C<sub>H</sub>2 z lidského IgG1, G2 nebo G4. Uvedená sekvence obsahující jednu nebo více z následujících modifikací (substituce nebo delece aminokyselin) v uvedených polohách (popisuje se v publikaci Kabat et al., „Sequences of proteins of immunological interest.“ Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH, 1991):

Poloha	aminokyselina
233	P

234	V
235	A
236	(není zbytek) nebo G
327	G
330	S
331	S

V preferovaném provedení vynálezu tyto substituce připravují v „blocích“ 233 až 236 a/nebo 327, 330, 331. Tak mutovaná oblast v oblasti C<sub>H</sub>2 bude vykazovat 100 % homologii s podtřídou, ze které pochází substituované zbytky, přičemž se snižuje pravděpodobnost, že oblast bude reprezentovat epitop B buňky nebo T buňky v imunitním systému.

Připravilo se několik mutantních imunoglobulinů založených na IgG1, IgG2 nebo IgG4, které vykazují dané rysy, a ukázalo se, že mají požadované vlastnosti. Ačkoli některé mutace jednotlivých zbytků ve vazebných molekulách se připravily už dříve, specifické kombinace jsou nové.

Preferované formy vazebné molekuly se popisují dále v textu:

#### Efektorová oblast

Peptid obsahuje efektorovou oblast, která má aminokyselinovou sekvenci v podstatě homologní s celou nebo částí konstantní oblasti lidského imunoglobulinu, přičemž se upřednostňuje C-oblast IgG.

Publikovala se řada sekvencí lidských C oblastí (jak se popisuje v publikaci Clark (1997) „IgG Effector Mechanisms“ in „Antibody Engineering“ Ed. Capra, Pub. Chem. Immunol., Basel, Kurger, Vol. 65 pp 88-110). Jiné sekvence těžkých řetězců lidského imunoglobulinu se mohou získat z databází SwissProt a PIR za použití software Lasergene (DNASTar Limited, London UK)

a přístupových čísel A93433, B90563, A90564, B91668, A91723 a A02146 v případě C oblasti lidského řetězce Igy-1, A93906, A92809, A90752, A93132, A02148 v případě C oblasti lidského řetězce Igy-2, A90933, A90249, A02150 v případě C oblasti lidského řetězce Igy-4 a A23511 v případě C oblasti lidského řetězce Igy-3.

Homologie (nebo shoda nebo podobnost) se může hodnotit libovolnou vhodnou metodou. Homologie se může prokázat na úrovni kódující nukleotidové sekvence nebo kódované aminokyselinové sekvence. Termín „v podstatě homologní“, znamená, že obsahuje aminokyselinovou sekvenci sdílející alespoň 50 % nebo 60 % nebo 70 % nebo 80 % homologii, nejvíce se upřednostňuje alespoň 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % nebo 99% homologie s referenčním imunoglobulinem.

Termín podobnost nebo homologie se může definovat a stanovit použitím programu TBLASTN, který se popisuje v publikaci Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, který nachází standardní použití v oboru a preferovaný standardní program BestFit, který je součástí Wisconsin Package, Version 8, September 1994 (Genetics Computer Group, 575 Scinece Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711). Program BestFit umožňuje optimální uspořádání nejlepšího segmentu podobnosti mezi dvěma sekvencemi. Optimální uspořádání se provede začleněním děr, přičemž se maximalizuje počet párů za použití algoritmu lokální homologie podle Smithe a Watermana.

Toto hodnocení je možné udělat bez nadměrného úsilí odborníka ve spojení s hodnocením požadované kombinace aktivit za účelem rozpoznat molekulu podle vynálezu.

Vedle toho, že molekuly vykazují sníženou afinitu vůči Fcy-RI, Fcy-RIIa, Fcy-RIIIa a Fcy-RIIIb, aby si uchovaly

schopnost vázat inhibiční receptor Fc $\gamma$ -RIIb nebo vykazovaly určitý stupeň pomoci efektorové molekuly. Upřednostňuje se, aby schopnost vázat se byla vyšší než afinita v případě receptoru Fc $\gamma$ -RIIa a více se upřednostňuje, aby odpovídala rodičovské oblasti Ig, ze které se odvodila. Získané výsledky ukazují, že vyvinuté vazebné molekuly vykazují uvedené vlastnosti. V dosavadním stavu techniky nebylo výhodné, aby se navázání oblastí Fc na receptor Fc $\gamma$ -RIIa a Fc $\gamma$ -RIIb manipulovalo nezávisle. Tato schopnost může doplnit další požadované funkce (což indikuje schopnost vázat se na protein A), čímž se zvýší terapeutický potenciál vazebné molekuly.

Počet publikací zdůrazňuje důležitou úlohu, kterou může mít receptor Fc $\gamma$ -RIIb při inhibici buněčného postupu (popisuje se v publikaci Daeron et al., 1995, *Immunity* 3(5): 635-46, Van den Herik et al., 1995 *Blood* 85(8): 2201-11, Sarmay et al., 1996 *Immunol. Lett* 54(2-3): 93-100, Fong et al., 1996 *Immunol. Lett.* 54(2-3): 83-91, Sarmay et al., 1996 *J. Biol. Chem.* 271(48): 30499-504, Unkeless and Jin, 1997, *Curr. Opin. Immunol.* 9(3): 338-43, Isakov, 1997 *Immunol. Res.* 16(1): 85-100, Hunter et al., 1998 *Blood* 91(5) : 1762-8, Malbec et al., 1998 *J. Immunol.* 160(4): 1647-58, Clynes et al., 1999 *J. Exp. Med.* 189(1): 179-85). V těchto publikacích se ukázalo, že receptor Fc $\gamma$ -RIIb, když se zkříženě váže na jiné receptory, může inhibovat jejich signál, přičemž inhibuje takové procesy, jako je aktivace B buňky, degranulaci žírné buňky a fagocytózu makrofágy.

Vazebné molekuly podle vynálezu, které si udržují tuto aktivitu, se mohou použít ne pouze pro soutěžení a kompetitivní inhibici nežádoucích interakcí protilátka-antigen (tak jako autoantigeny nebo aloantigeny), ale také při nekompetitivní inhibici těchto procesů, například prevencí produkce dalších autoprotilátek nebo aloprotilátek pomocí

inhibice aktivace B buněk. Jiné příkladné aplikace tohoto inhibičního účinku se popisují dále v textu ve vztahu k terapii alergie a astmatu (inhibice degranulace žírných buněk) a molekul anti-RhD (inhibice fagocytózy).

Upřednostňuje se, aby se samotná efektorová oblast odvodila z konstantní oblasti lidského imunoglobulinu, přičemž se více upřednostňuje, aby se tato oblast získala z C-oblasti IgG.

Upřednostňuje se, aby obsažená aminokyselinová sekvence byla v podstatě homologní se sekvencí  $C_{H2}$  (to představuje přibližně zbytky 231 až 340) z lidského IgG1, G2 nebo G4, které vykazují upravené aminokyseliny, jak se popisuje shora v textu.

Nejvíce preferované sekvence  $C_{H2}$  jsou zobrazeny na obrázku č. 17, zvláště ty označené G1 $\Delta$ ab, G2 $\Delta$ a nebo G1 $\Delta$ ac.

Libovolná z těchto sekvencí se může v molekulách podle vynálezu kombinovat s přirozenou nebo upravenou oblastí  $C_{H3}$  a s přirozenou nebo upravenou oblastí spojení plus se sekvencemi oblasti  $C_{H1}$ .

Odborník preferuje, že není nutné, aby jiné části efektorové oblasti (nebo jiné oblasti molekuly) obsahovaly přirozené sekvence, zvláště může být nutné kombinovat zde popsané modifikace sekvencí, které se například vybraly z literatury, přičemž je nutné, aby si pouze zachovaly požadované aktivity. Pro odborníka bude výhodné, když vazebné molekuly obsahující modifikované (například způsobem adice aminokyseliny, inzercí, delecí nebo substitucí) efektorové oblasti spadají do rozsahu vynálezu.

Zvláště preferované mohou být sekvence „nulového alotypu“, což jsou sekvence získané z těžkého řetězce IgG (popisuje se v publikaci WO 92/16562), kde alotypické zbytky podléhají

mutaci, aby se párovaly s těmi, které se nacházejí v jiných molekulách lidské podtřídy IgG. To může minimalizovat skutečnost, že sekvence se jeví libovolnému jedinci jako cizorodé.

#### Vazebná oblast a cílová molekula

Molekula peptidu obsahuje vazebnou oblast schopnou vázat se na cílovou molekulu.

Vazebná oblast bude mít schopnost interagovat s cílovou molekulou, kterou přednostně může být jiný polypeptid, ale může být libovolným cílem (například sacharid, lipid (takový jako fosfolipid) nebo nukleová kyselina). Upřednostňuje se, když interakce bude specifická. Vazebná oblast se může získat ze stejného zdroje nebo z odlišného zdroje než je efektorová oblast.

Zatímco efektorová oblast se obecně v případě získá z protilátky, vazebná oblast se může odvodit z libovolné molekuly se specifitou pro jinou molekulu, například enzym, hormon, receptor (vázaný na buňce nebo cirkulující) pro cytokin nebo pro antigen (který specificky váže protilátky).

Přednostně obsahuje celou nebo část protilátky nebo její derivát, zvláště přirozenou nebo upravenou variabilní oblast protilátky. Tak vazebná molekula podle vynálezu může poskytovat vazebnou oblast protilátek a těžký řetězec lidského imunoglobulinu pocházející z hlodavců nebo *Camelidae* (popisuje se v dokumentu WO 94/25591), jak se popisuje shora v textu.

Preferují se také molekuly, které vykazují více než jeden typ vazebné oblasti, jako jsou bispecifické protilátky (popisuje se v dokumentu PCT/US92/09965). V těchto případech jedno „rameno“ se váže na cílovou buňku a druhé rameno se váže

na druhou buňku, aby spustily usmrcení cíle. V takových případech může být nutné minimalizovat působení efektorové části, která může jinak aktivovat další buňky, které interferují s požadovaným výstupem. Samotná „ramena“ (to je vazebná oblast) se může zakládat na oblastech Ig (například Fab) nebo může pocházet z jiných proteinů, jako je fúzní protein, jak se popisuje dále v textu.

Vazebná molekula může obsahovat více než jeden polypeptidový řetězec, které jsou spojeny například kovalentní vazbou nebo jiným způsobem (například hydrofóbní interakcí, iontovou interakcí nebo prostřednictvím sulfidových můstků). Může například obsahovat lehký řetězec v kombinaci s těžkým řetězcem, který obsahuje efektorovou oblast. Může se například použít libovolný vhodný lehký řetězec, nejběžnějším alotypem lehkého řetězce kappa v běžné populaci je Km(3). Proto může být nutné využít tento běžný alotyp lehkého řetězce kappa, protože relativně málo členů populace ho bude považovat za cizorodý.

V typickém případě cílem bude antigen přítomný na buňce nebo receptor s rozpustným ligandem, o který protilátky soutěží.

Tyto látky se mohou vybrat jako terapeutický cíl, přičemž je nutné, aby se navázaly na molekulu, která vykazuje vlastnosti popisované shora v textu, může například soutěžit nebo nahrazovat požadovanou protilátku. V jiném případě může být nutné, aby se molekuly vážaly na cílovou molekulu, aniž dojde k poškození zprostředkované buňkou, zánětu způsobenému protilátkami nebo lyzi komplementem. Stejně efektorová oblast může fungovat primárně při zprostředkování transportu a/nebo zlepšení poločasu rozpadu séra. V takových případech vazebná oblast a cílová molekula může být libovolný systém, pro něhož tyto rysy budou výhodné.

Dále v textu se uvádí výběr aplikací, kde vazebné molekuly podle vynálezu se mohou použít jako terapeutické protilátky, které nesou inzert oblastí Fc:

- 1) kompetice mateřských aloprotilátek IgG vůči antigennímu epitopu na krevních buňkách zárodku/novorozence.

Aloimunitní poruchy krevních krvinek zárodku mají běžnou patogenezi. Dochází k syntéze aloprotilátek matkou proti dědičnému antigenu na červených buňkách zárodku, granulocytech nebo krevních destičkách. Pak následuje transport aloprotilátek placentou. U zárodku nebo novorozence dochází k poškození červených krvinek zárodku potažených protilátkami, které mohou vést ke klinicky podstatnému poškození oběhového systému relevantních buněk. Terapeutické protilátky vůči relevantnímu epitopu, ale s Fc, které nespouštějí destrukci, mohou soutěžit s mateřskými protilátkami o možnost navázání na buňky zárodku, čímž inhibují jejich poškození.

Protilátky proti aloantigenům červených buněk způsobují hemolytické onemocnění plodu nebo novorozence.

Nejdůležitější aloantigeny červených krvinek jsou v krevních skupinových systémech Rhesus a Kell. Výskyt hemolytického onemocnění způsobený antigenem RhD se dramaticky snižuje vzhledem k zavedení post-natální profylaxe, ale stále se vyskytují případy, které jsou způsobeny mateřskou citlivostí během prvního těhotenství. Další antigeny Rhesus (C, c, E, e) mohou také způsobit hemolytické onemocnění, stejně jako protilátky vůči antigenu Kell (K1), které navíc omezují erythropoiezu v kostní dřeni zárodku.

Současná terapie silně poškozených plodů spočívá v regulované vnitroděložní transfúzi červených krvinek, které nenesou antigen. Ukázalo se, že infúze nespecifického imunoglobulinu není v těchto podmínkách účinná. Anémie a

hyperbilirubinémie u novorozence může vyžadovat transfúzi a/nebo fototerapii.

Experimenty, ve kterých se používají konstrukce Fc se specifitou vůči RhD (označené Fog-1) ukázaly jejich defekt ve spouštění efektorových mechanismů (aktivace monocytů, jak se detekuje chemoluminiscencí a ADCC) a také se ukázalo, že inhibují chemoluminiscenci a ADCC spouštěné lidským sérem, které obsahuje polyklonální anti-D. Už dříve se ukázalo, že ADCC a chemoluminiscence znamená poškození červených krvinek *in vivo*. Dříve publikovaná práce také demonstruje schopnost Fog-1 soutěžit s většinou lidských anti-D sér o epitopy na proteinu RhD.

Protilátky proti aloantigenům krevních destiček způsobují aloimunitní trombocytopenii zárodku a novorozence.

Nejvíce relevantní antigen je lidský destičkový antigen (HPA)-1a. Protilátky vůči antigenu HPA-1a komplikují 1 z 350 normálních těhotenství a vedou k silné trombocytopenii v jednom z 1 200 případů zárodků. Velmi silně postižené případy vedou k intrakraniálnímu krvácení nebo způsobují smrt. Současná terapie zahrnuje pravidelnou každotýdenní transfúzi krevních destiček, které ne nesou HPA-1a (při této léčbě hrozí nebezpečí úmrtí 0,5 %), a vysoké dávky intravenózního imunoglobulinu, které se aplikují matce. Tato léčba vykazuje různou a nepředvídatelnou účinnost. HPA-1a se definuje jediným epitopem na destičkovém glykoproteinu IIIa (GPIIIa) a jednořetězcový Fv rozeznávající tento epitop je dostupný u instituce University of Cambridge Division of Transfusion Medicine (Griffin HM, Ouwehand WH. Lidské monoklonální protilátky specifické pro leucin-33 (PA<sup>A1</sup>, HPA-1a) tvoří destičkový glykoprotein IIIa z knihovny genu fága V, popisuje se v publikaci Blood 1995, 86: 4430-4436). Ukázalo se, že navázání protilátek založených na této konstrukci vůči lidským

destičkám se inhibuje lidským sérem proti HPA-1a. Inhibice byla nejvíce konzistentní v případě séra, které vykazuje nejvyšší titer specifických protilátek, které jsou spojeny s nejtěžším onemocněním. To indikuje, že rekombinantní protilátky a sérové protilátky se váží na stejný epitop na destičkách.

Vedle kompetitivního vazebného účinku terapeutické protilátky podle vynálezu mohou také vyvolat výhodný inhibiční účinek prostřednictvím FcγRIIb.

2) Kompetice s autoprotilátkami proti epitopu na autoantigenu

Autoprotilátky zprostředkovaly poškození krevních buněk

Hemolytická anemie způsobená autoprotilátkami typu IgG a trombocytopenie způsobená autoprotilátkami vykazují běžné mechanismy poškození krevních buněk. V obou případech autoprotilátky jsou cíleny na vybraný repertoár autoantigenů (Rh a K na červených buňkách a GPIIb/IIIa, GPIb/Ix/V na krevních destičkách). Navázání protilátek se zkrácenou délkou života krevních buněk způsobuje anemii nebo trombocytopenii. Není pravděpodobné, že autoprotilátky proti červeným krvinkám a krevním destičkám jsou cíleny na určitý počet epitopů B-buněk na jejich autoantigenech. Rekombinantní variabilní oblast protilátek proti těmto epitopům se může vytvořit technologií vyjadřující gen fága V. Terapeutické protilátky vůči relevantním epitopům, ale s inertním Fc by mohly soutěžit s autoprotilátkami krevních buněk pacienta při navázání na autoantigen, tak se inhibuje poškození krevních buněk.

„Goodpasture's" syndrom (onemocnění anti-glomerulární bazální membrány (GBM)).

To je hlavní případ rychle postupující glomerulonefritidy, která vede k plicnímu krvácení a během týdnů a měsíců od

počátku onemocnění dojde ke konečnému selhání ledvin. Běžná terapie závisí na dialýze v kombinaci s intenzivní výměnou plazmy a imunosupresivní terapií, která se může komplikovat virovou nebo plísňovou infekcí, která ohrožuje život. Existuje důkaz, že toto onemocnění je zprostředkováno autoprotilátkami a autoantigenem lokalizovaným na kolagenu typu IV, což je hlavní komponent GBM. Ukázalo se, že autoprotilátky, které způsobují onemocnění GBM se váží na nekolagenní oblast (NC1) řetězce  $\alpha 3(\text{IV})$ . Gen kódující tuto sekvenci (COL4A3) se klonoval a sekvenoval. Vytvořila se hypotéza, že účinek nebezpečných anti-GBM autoprotilátek se může neutralizovat monoklonální kompetitorovou molekulou IgG, která cílí imunodominantní epitop na  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  a je vybavena biologicky neaktivní oblastí Fc. Vyvinuly se rekombinantní chimerové protilátky IgG, které se váží na imunodominantní epitop  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ , ale kterému chybí klasické funkce efektoru. Toho je možné dosáhnout, když se vyvinou a charakterizují geny, které kódují variabilní oblasti myších anti- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  (popisuje se v publikaci Pusey CD et al., Lab Invest 1987, 56, 23-31 a Ross CN et al., Lab Invest 1996, 74, 1051-1059).

Vedle kompetitivního vazebného účinku terapeutické protilátky podle vynálezu mohou také vyvolat žádoucí inhibiční účinek pomocí Fc $\gamma$ RIIb.

### 3) Alergie a astma

Alergie a astma vznikají z nežádoucí imunitní odezvy na běžné antigeny, které se nachází v prostředí. Jsou to například proteiny pylů trav, roztoči a řada dalších zdrojů antigenů. Jde například o protein Der P 1 roztoče *Dermatophagoides pteronyssinus*. Postižení jednotlivci produkují vysoké množství imunoglobulinů, zvláště třídy IgE. Tyto protilátky IgE jsou schopny se vázat s vysokou afinitou

na receptor Fc-epsilon RI na žírných buňkách a na eosinofily. Zkřížené navázání IgE a alergenu na receptor vede k aktivaci buněk a k degranulaci. Při tom se uvolňuje řada zánětlivých mediátorů, které mohou způsobit vážné symptomy nebo dokonce smrt, což může být výsledek anafylaktické reakce. Předpokládají se dva mechanismy působení místních protilátek. Nejdříve by protilátky IgG s inertní oblastí Fc mohly soutěžit o navázání alergenu na IgE. To bude bránit zkříženému navázání IgE a proto zabrání aktivaci buněk. V případě uvedeného mechanismu protilátky IgG s inertním Fc budou přímo soutěžit o navázání na alergen s IgE.

Zadruhé mechanismus bude zahrnovat úlohu negativního signálu prostřednictvím receptoru FcγRIIb. Ukázalo se, že zkřížené navázání Fc gamma RIIb a Fc epsilon RI vede k inhibici aktivace signálů, které je možné vidět pouze v případě, že jsou zkříženy pouze receptory Fc epsilon RI. Tak zavedení protilátek IgG s vazebnou kapacitou Fc pro receptor Fc gamma RIIb a antigenní specifitu pro alergen může vést k inhibici aktivace žírných buněk potažených IgE a eozinofilů. V tomto případě protilátky IgG také zprostředkovávají silný negativní účinek, jestliže se váží na alergen pomocí různých míst na IgE tak, že ve stejném okamžiku se mohou také vázat na alergen.

#### 4) Zánětlivé poruchy například Crohnova nemoc

Existuje řada poruch imunitního systému, které způsobují patologické jevy, jako výsledek chronického stavu aktivace imunitních buněk (leukocytů), které zahrnují T-lymfocyty, neutrofilny a buňky NK. Tuto chronickou aktivaci je možné v normálním případě vidět jako stádium zánětu kontinuální migrace aktivovaných buněk do postižených tkání. Za účelem migrace do tkáně buňky se musí vystavit působení zánětlivým mediátorům a musí na ně reagovat a pak se regulují adhezivní

molekuly, přičemž se jim umožní, aby adherovaly na buňky, které tvoří stěnu krevních cév a pak migrují mezi buňkami stěn cév a do tkáně. Mělo by být možné zastavit tento cyklus zánětu buď zablokováním adhezních molekul na povrchu leukocytů nebo odpovídajících ligandů na aktivovaných epiteliálních buňkách, které tvoří stěny cév. Takovým aktivačním antigenem je VAP-1 a protilátka s inertním Fc, která se váže na tuto molekulu, by měla bránit adhezenci leukocytů a migraci na místa zánětu, přičemž se poruší cyklus chronické aktivace.

#### 5) Inhibice interakce ligand/receptor

##### Srpkovitá anémie

Homozygoty variant lidského hemoglobinu charakterizovaný substitucí valinu za glutamovou kyselinu (HbSS) vede k chronické hemolýze a má tendence tvořit taktoidní formaci v deoxygenovaném stádiu. To vede k tomu, že červené krvinky upraví srpkovitý tvar v mikrocirkulaci, což způsobuje krizi srpkovitých buněk v daných oblastech. Ty mohou být trombotické (v kostech, plicích, mozku nebo břichu), plastické, hemolytické nebo spojené s masivní sekvestrací červených buněk v slezině a játrech. Je dáno, že během těchto krizí se červené krvinky adherují na endoteliální buňky. Tento proces adheze je založen na interakci receptoru s jejich ligandy. Dvě z dominantních drah adheze jsou interakce mezi Lutheranem a lamininem a mezi trombospondinem a ještě nedefinovaným membránovým lipidem červenýchrvinek. V experimentech se zvířaty se získaly důkazy, že rekombinantní lidská variabilní oblast protilátek proti trombospondinu snižuje adhezi srpkovitých buněk červenýchrvinek na endoteliální buňky. Ukázalo se, že mohou projevením genu fága V vyvinout podobné variabilní oblasti rekombinantních protilátek proti oblasti lutheranu vázající se na laminin (membránová proximální oblast), která blokuje interakci s lamininem. Tyto fragmenty variabilní oblasti protilátek se mohou vybavit inertními

doménami Fc za vzniku terapeutických protilátek, které jsou schopny interferovat s adherencí srpkujících červených krvinek na endoteliální buňky, aniž dojde k destrukci červených buněk.

Blokování destičkových kolagenových receptorů zprostředkované protilátkami

Existuje podstatný důkaz, že dva receptory jsou velmi podstatné pro aktivaci krevních destiček pomocí subendoteliálních kolagenů, dokonce iniciují trombózu. Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (destičkový glykoprotein Ia/IIa), jehož primární funkce je adheze, a neintegrinový glykoprotein VI (GpVI), který je také podstatný pro aktivaci, předcházející vylučování a agregaci. Rekombinantní lidské protilátky se mohou tvořit projevením genu fága V, který rozeznává různé domény v každém receptoru a ty se mohou použít při produkci vedoucích protilátek s inertní doménou Fc vůči anti-trombotické terapii založené na kolagenu. Tato metoda se může použít při zmírnění koronární trombózy restenózy po angioplastice a trombotických komplikacích spojených se zavedením bypasu.

6) Monoklonální protilátky se mohou někdy použít při zablokování buněčných funkcí. OKT3 se například používá k imunosupresi T-buněk blokováním receptoru T-buněk a protilátky CD18 se používají jako prevenci adheze buňka-buňka prostřednictvím molekul integrinu. Navázání Fc na receptory Fc mohou vyvolat vážné vedlejší účinky pomocí stimulovaného uvolnění cytokinů a zánětu.

7) Oblasti Fc protilátek se někdy připojují na jiné rekombinantní proteiny, přičemž vznikají fúzní molekuly s prodlouženým biologickým poločasem života. Tak receptor TNF se může připojit k lidskému Fc IgG4 za vzniku molekuly, která inhibuje účinky rozpustného TNF a CTLA4 se připravil jako fúzní protein s IgG Fc a používá se k blokování signalizace

pomocí koreceptorové molekuly B7 (ligand pro CTLA4) na povrchu buňky. Avšak cytokin spuštěný Fc fúzního proteinu je nežádoucí.

V oboru jsou dobře známy domény V nebo jiné vazebné oblasti v souladu s typy aplikace, popisovanými shora v textu. Například vazebná oblast CD3 (například YTH12.5) se popisuje v publikaci Routledge et al (1991) Eur J. Immunol. 21, 2717-2725 a Bolt et al., (1993) Eur J. Immunol. 23, 403-411. Vazebná oblast CD52 (například CAMPATH-1) se popisuje v publikaci Riechmann et al., (1988) Nature 332, 323-327. Vazebná doména VAP-1 se popisuje v publikaci Salmi et al., (1993) J. Exp. Med. 178: 2250-60 a Smith et al., (1989) J. Exp. Med. 188: 17-27. Oblast Der P I (například 2C7) se popisuje v publikaci McElveen et al., (1998) Clin. Exp. Allergy 28, 1427-1434).

Tak vazebná molekula, která se neváže na receptory Fc a způsobuje odumírání a neaktivuje komplement, ale která se neváže na cílovou molekulu, by se mohla použít ve všech shora uvedených příkladech při minimalizaci libovolných vedlejších účinků. Specificky takové blokační protilátky by se mohly zavést do situací popsaných v odstavci 1 až 5 shora v textu a bránit tak nežádoucímu poškození přirozeně se vyskytujících protilátek. Stejně blokující oblasti typu Fc budou oblasti Fc vybrané tak, aby se použily při přípravě rekombinantních protilátek, jako jsou protilátky CD3 nebo CD18 popsané v odstavci 6 shora v textu nebo jako Fc pro fúzi popsanou v odstavci 7 shora v textu.

Vazebné a efektorové domény se mohou kombinovat libovolnou vhodnou metodou. Například domény se mohou spojit kovalentně prostřednictvím bočních řetězců. V jiném případě sulfydrylové skupiny vytvořené chemickou redukcí cysteinových zbytků se použily ke zkřížení protilátkových oblastí (popisuje se

v publikaci Rhind S. K. (1990) EP 0385601 Cross-linked antibodies and processes for their preparation). Nakonec chemická modifikace skupin sacharidů se použije při vytvoření reaktivních skupin pro účely zkřížení. Tyto metody jsou standardní techniky dostupné v oboru. Mohou být zvláště aplikovatelné v provedení vynálezu, kde vazebný polypeptid obsahuje neproteinové oblasti nebo skupiny.

V obecném případě je při expresi vazebné molekuly ve formě fúzního proteinu vhodnější použít rekombinační metody. Vynález popisuje metody a materiály, jak se uvádí dále v textu.

#### Nukleové kyseliny

Vynález dále popisuje nukleovou kyselinu kódující vazebnou molekulu, jak se popisuje shora v textu.

Nukleová kyselina podle vynálezu může zahrnovat cDNA, RNA, genomovou DNA (zahrnující introny) a upravené nukleové kyseliny nebo analogy nukleových kyselin (například nukleovou kyselinu peptidu).

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou čistit a/nebo izolovat z jejich přirozeného prostředí a mohou se získat v podstatě čisté nebo v homogenní formě nebo bez dalších nebo v podstatě bez dalších nukleových kyselin. Termín „izolovaná“ zdůrazňuje všechny tyto možnosti.

Molekuly nukleových kyselin mohou být zcela nebo částečně syntetické. Mohou být zvláště v rekombinaci se sekvencemi nukleové kyseliny, které se společně nenacházejí v přírodě. Mohou se ligovat nebo jinak uměle kombinovat. V jiném případě se mohou přímo syntetizovat, například za použití automatického syntetizéru.

Vynález dále popisuje konstrukci nukleové kyseliny, například replikovatelný vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny.

Vektor zahrnující nukleovou kyselinu podle vynálezu nemusí zahrnovat promotor nebo jiné regulační sekvence, zvláště, jestliže vektor se bude používat k zavedení nukleové kyseliny do buněk v případě rekombinace do genomu.

Upřednostňuje se, aby nukleová kyselina ve vektoru byla řízena a operativně spojena s vhodným promotorem nebo s jinými regulačními elementy v případě transkripce v hostitelské buňce, jako je mikrobiální (například bakteriální, kvasinková, buňka vláknitých hub) nebo eukaryontní (například hmyzí, rostlinná, savčí) buňka.

Vektor může zvláště obsahovat gen (například *gpt*), aby umožňoval selekci v hostiteli nebo v hostitelské buňce a jeden nebo více zesilovačů, které jsou pro hostitele vhodné.

Vektor může být expresivní vektor se dvěma funkcemi, který funguje ve více hostitelích. V případě genomové DNA může obsahovat svůj vlastní promotor nebo jiné regulační elementy a v případě cDNA může být řízen vhodným promotorem nebo jinými regulačními elementy vhodnými pro expresi v hostitelské buňce.

Termín „promotor“ znamená sekvenci nukleotidů, ze které se může transkripce iniciovat DNA operativně spojenou po směru exprese genu (to je ve směru 3' konce na kódujícím řetězci dvouřetězcové DNA). Promotorem může být indukovatelný promotor.

Termín „operativně spojený“ znamená spojený jako část stejné molekuly nukleové kyseliny, vhodně umístěný a orientovaný za účelem transkripce, která se inicializuje

z promotoru. Když je DNA operativně spojená s promotorem, znamená to, že iniciace transkripce se reguluje promotorem.

Vynález popisuje genovou konstrukci, upřednostňuje se replikovatelný vektor, který obsahuje promotor operativně spojený s nukleotidovou sekvencí podle vynálezu.

V obecném případě jsou odborníci schopni zkonstruovat vektory a navrhnout protokoly pro expresi rekombinantních genů. Mohou se vybrat a zkonstruovat vhodné vektory, které obsahují vhodné regulační sekvence zahrnující promotorové sekvence, terminační fragmenty, polyadenylační sekvence, sekvence zesilovače, geny markerů a jiné sekvence, které jsou vhodné (popisuje se například v publikaci *Molecular cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press*).

Řada známých metod a protokolů vhodných pro manipulaci nukleové kyseliny, například při přípravě konstrukcí nukleové kyseliny, mutageneze, sekvenování, zavedení DNA do buněk a exprese genu a analýza proteinů se popisuje v publikaci *Current Protocols in Molecular Biology, second Edition, Ausubel et al., eds., Jaohn Wiley and Sons, 1992, Molecular cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press*).

Hostitelské buňky a metody

Vynález dále popisuje buňky transformované expresivními vektory, které se definují shora v textu. Také se popisují buněčné kultury (přednostně hlodavci) a produkty buněčných kultur, které obsahují vazebné molekuly.

Dále se popisují metody přípravy vazebných molekul podle vynálezu, které obsahují:

- i) kombinaci nukleové kyseliny kódující vazebnou doménu s nukleovou kyselinou kódující efektorovou doménu za vzniku konstrukce nukleové kyseliny,
- ii) umožnění exprese konstrukce ve vhodné hostitelské buňce.

Kombinace za účelem produkce konstrukce se může provést libovolnou vhodnou metodou, která je dobře známa v oboru. Je to například ligace fragmentů (například restriční fragmenty) nebo použití různých templátů v jednom nebo více amplifikačních krocích, například použití PCR.

Způsoby produkce protilátek (a tudíž vazebné oblasti) zahrnují imunizaci savce (například člověka, myši, krysy, králíka, koně, kozy, ovce, velblouda nebo opice) s vhodným cílovým proteinem nebo jeho fragmentem. Protilátky se mohou získat z imunizovaných zvířat za použití libovolného způsobu známého v oboru a mohou se testovat přednostně za použití navázání protilátek na uvedený antigen.

Může se například použít metoda westernova přenosu nebo imunoprecipitace (Armitage et al., 1992, Nature 357: 80-82).

Klonování a exprese chimérových protilátek se popisuje v dokumentech EP-A-0120694 a EP-A-0125023.

Nukleová kyselina kódující efektorovou oblast se může vytvořit v souladu s vynálezem místně řízenou mutagenezí, například zde popsanými způsoby nebo způsoby například uvedenými v dokumentech WO 92/16562 nebo WO 95/05468 (Lynxvale Ltd.).

#### Další aspekty

Vynález dále popisuje použití vazebné molekuly podle vynálezu, která předchází, inhibuje nebo jinak interferuje s navázáním druhé vazebné molekuly na cílovou molekulu. To

může zahrnovat soutěž nebo nahrazení protilátek z terapeuticky relevantního cílového antigenu nebo buňky.

Vynález dále popisuje činidlo, které obsahuje vazebnou molekulu, jak se popisuje shora v textu, ať už vzniká rekombinací nebo jiným způsobem.

Vynález dále popisuje farmaceutický prostředek, který obsahuje vazebnou molekulu, jak se popisuje shora v textu, plus farmaceuticky přijatelný nosič.

Vynález také popisuje způsob léčby pacienta, který zahrnuje aplikaci farmaceutického prostředku, jak se popisuje shora v textu, pacientovi nebo do vzorku, který se pacientovi odebral a zase se mu vrací. Zvláště způsob léčby následujících onemocnění: štěp versus hostitel, odmítnutí transplantovaného orgánu, odmítnutí transplantované kostní dřeně, autoimunita, aloimunita, alergie, chronické nebo akutní zánětlivé onemocnění.

Vynález dále popisuje způsob léčby pacienta, který zahrnuje způsobení a umožnění exprese nukleové kyseliny kódující vazebnou molekulu, jak se popisuje shora v textu, přičemž vazebná molekula u pacienta projevuje své účinky *in vivo*. V obecném případě dojde u pacienta k expresi nebo za zvláštních okolností, pokud pacient je kojeneček, se exprese projeví u matky pacienta.

Vynález také popisuje použití vazebné molekuly, jak se popisuje shora v textu, při přípravě farmaceutického prostředku, za účelem modifikace imunitní odezvy, zvláště farmaceutického prostředku vhodného pro léčbu onemocnění uvedeného shora v textu.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 je znázorněné rozdělení buněk, které nesou Fc $\gamma$ RI pomocí RBC potažených protilátkami Fog-1. R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> RBC se potáhly protilátkami Fog-1 v rozmezí koncentrací protilátek s buňkami B2KA, které rostou na destičce s 96 prohlubněmi a stanovilo se procento buněk B2KA s různými RBC. Značky znázorňující chybu označují hodnoty standardní odchylky v případě tří prohlubní. V případě mutantů Fog-1 G1 $\Delta$ b, G1 $\Delta$ c, G1 $\Delta$ ab, G1 $\Delta$ ac, G2 $\Delta$ a, G4 $\Delta$ b a G4 $\Delta$ c, jako v případě G2 (zobrazeno) nedošlo rozdělení mezi buňkami B2KA a RBC při žádné koncentraci potažení.

Na obrázku č. 2 je znázorněné fluorescenční barvení buněk nesoucích Fc $\gamma$ RI. Buněčné linie transfekované Fc $\gamma$ RI, což jsou B2KA (a a b) a 3T3 + Fc $\gamma$ RI +  $\gamma$ -řetězec (c a d) se inkubovaly postupně s protilátkami CAMPATJ-1 (a a c) nebo Fog-1 (b a d), s biotinylovanými anti-lidskými protilátkami  $\kappa$  a ExtrAvidin-FITC. Intenzita fluorescence se měřila v případě 10 000 případů a vynesl se do grafu geometrický průměr hodnot fluorescence.

Na obrázku č. 3 je histogram reprezentující fluorescenčně zbarvené buňky nesoucí Fc $\gamma$ RI. Buňky B2KA se barvily jako v případě obrázku č. 2 za použití 100  $\mu$ g/ml protilátek ze série CAMPATH-1. Histogram ukazující počet buněk, které spadají do každého fluorescenčního kanálu se překryl reprezentativními protilátkami.

Na obrázku č. 4 jsou znázorněna CL odezva lidských monocytů na RBC senzibilizovaných sérií protilátek Fog-1. R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> RBC se potáhly protilátkami mimo rozmezí koncentrací. Pro každý vzorek se stanovil počet molekul protilátek vázaných na buňku a CL odezva monocytů na RBC.

Na obrázku č. 5 je znázorněna inhibice CL způsobená protilátkami Fog-1 G1 pomocí jiných protilátek Fog-1. RBC se senzibilizovaly pomocí Fog-1 G1 v koncentraci 2  $\mu\text{g/ml}$  a označily se různé koncentrace protilátek Fog-1. Tyto protilátky na obrázku č. 4 vykazují nízkou odezvu CL. Měřila se CL odezva monocytů. Odezva způsobená samotným G1 v koncentraci 2  $\mu\text{g/ml}$  se bere jako 100 %.

Na obrázku č. 6 je znázorněna inhibice CL odezvy na klinické sérum pomocí Fog-1 G2 $\Delta$ a. RBC se senzibilizovaly konstantním množstvím Fog-1 G1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo klinicky relevantním sérem a různým množstvím Fog-1 G2 $\Delta$ a. 100 % odezvy se dosáhlo se standardním množstvím BRAD 5. Při nepřítomnosti Fog-1 G2 $\Delta$ a % odezvy byly G1: 150 %, sérum A: 142%, sérum B: 265%, sérum C: 200 %, sérum D: 163 %, sérum E: 94 %, anti-C+D sérum: 259 % a anti-K sérum: 119%.

Na obrázku č. 7 je zobrazena úplná lyze zprostředkovaná sérií protilátek CAMPATH-1. Lidské PBMC se značily  $^{51}\text{Cr}$  a inkubovaly se s protilátkami v přítomnosti séra, jako zdroje komplementu. Hodnoty vyjádřené v % uvolnění specifického Cr je vyneseno, jako míra vyskytující se lyze.

Na obrázku č. 8 je znázorněna inhibice pomocí CAMPATH-1 G2 $\Delta$ a úplná lyze zprostředkovaná CAMATH-1 G1. Úplná lyze se provedla stejným způsobem jako na obrázku č. 7, ale vzorky obsahovaly konstantní množství (konečná koncentrace 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ) CAMPATH-1 G1 a zvyšující se množství CAMPATH-1 G2 $\Delta$ a.

Na obrázku č. 9 je znázorněna ADCC zprostředkované sérií protilátek CAMPATH-1. Lidské PBMC se značily  $^{51}\text{Cr}$  a inkubovaly se s protilátkami. Po promytí se buňky inkubovaly s dalšími PBMC, které působí jako efektorové buňky, v poměru efektor:cíl

jako 20:1. Hodnoty vyjádřené v % uvolnění specifického Cr je vyneseno, jako míra vyskytující se lyze.

Na obrázku č. 10a je znázorněna ADCC RhD<sup>+</sup> RBC zprostředkované sériemi protilátek Fog-1.

Na obrázku č. 10 b je znázorněna ADCC RhD<sup>+</sup> RBC zprostředkované sériemi protilátek Fog-1.

Na obrázku č. 11a je znázorněna inhibice protilátkami Fog-1 ADCC RhD<sup>+</sup> RBC zprostředkované sériemi protilátek Fog-1 G1 v koncentraci 2 ng/mg.

Na obrázku č. 11b je znázorněna inhibice protilátkami Fog-1 ADCC RhD<sup>+</sup> RBC zprostředkované sériemi protilátek Fog-1 G1. RBC se senzibilizovalo ve směsi protilátek, které obsahují konstantní množství Fog-1 G1 (2 ng/ml) a odlišné koncentrace inhibičních protilátek.

Na obrázku č. 12 je znázorněna inhibice protilátkami Fog-1 ADCC RhD<sup>+</sup> RBC zprostředkované polyklonálními protilátkami anti-RhD v koncentraci 3 ng/mg.

Fluorescenční barvení buněk nesoucích FcγRIIa 131H/H. Buňky transfekované linie 3T6 + FcγRIIa 131H/H se inkubovaly s protilátkami Fog-1, které tvoří komplex s kozími F(ab')<sub>2</sub> anti-lidskými κ a pak oslími anti-kozím IgG konjugovanými s FITC. Intenzita fluorescence se měřila v případě 10 000 případů a vynesl se do grafu hodnoty geometrických průměrů fluorescence.

Na obrázku č. 13b je znázorněno fluorescenční barvení buněk nesoucích FcγRIIa 131R/R. Buňky transfekované linie 3T6 + FcγRIIa 131R/R se inkubovaly s protilátkami Fog-1, které tvoří komplex s kozími F(ab')<sub>2</sub> anti-lidskými κ. Intenzita

fluorescence se měřila v případě 10 000 případů a vynesl se do grafu hodnoty geometrických průměrů fluorescence.

Na obrázku č. 14a je znázorněno fluorescenční barvení buněk nesoucích FcγRIIb1\*. Experiment se provedl stejným způsobem jako na obrázku č. 13b za použití transfekované linie 3T6 + FcγRIIb1\* a vytvoření komplexů s protilátkami Fog-1 za použití směsi kozích F(ab')<sub>2</sub> anti-lidských κ konjugovaných s FITC a s kozími F(ab')<sub>2</sub> anti-lidskými κ, které nejsou značeny.

Na obrázku č. 14b je znázorněno fluorescenční barvení buněk nesoucích FcγRIIb1\*. Experiment se provedl stejným způsobem jako na obrázku č. 13 za použití transfekované linie CHO + FcγRIIb NA1.

Na obrázku č. 14c je znázorněno fluorescenční barvení buněk nesoucích FcγRIII NA2. Experiment se provedl stejným způsobem jako na obrázku č. 13 za použití transfekované linie CHO + FcγRIIIb NA2.

Na obrázku č. 15 je znázorněna tabulka č. 1, která porovnává mutace připravené v sekvencích divokého typu G1, G2 a G4.

Na obrázku č. 16 je znázorněna tabulka č. 2, která je shrnutím aktivit protilátek.

Na obrázku č. 17 jsou sekvence upravené a divokého typu C<sub>H</sub>2, které zahrnují ty sekvence označené G1Δab, G2Δab, G1Δac.

#### Příklady provedení vynálezu

Obecné materiály a metody

## Konstrukce expresivních vektorů

Počáteční bod konstantní oblasti IgG1 byl gen konstantní oblasti lidského IgG1 alotypu G1m(1,17) ve verzi vektoru M13tg131, který obsahuje upravený polylinker (popisuje se v dokumentu Clark, M. R.: WO 92/16562). Inzert IgG1 o velikosti 2,3 kb tak má restrikční místo BamHI na 5'konci a obsahuje restrikční místo HindIII vedle restrikčního místa BamHI. Na 3'konci po směru exprese genu od polyadenylačního signálu se objevily následující restrikční místa v pořadí 5' až 3': SphI, NotI, BglII, BamHI. Gen konstantní oblasti lidského IgG2 se získal jako HindIII-SphI fragment v M13tg131 a restrikční místo Hind III se poškodilo štěpením restrikčním enzymem HindIII, přesahující konce se vyplnily a opět se spojily ligací. Fragment SalI-SphI tohoto vektoru se klonoval tak, aby nahradil ekvivalentní fragment ve vektoru IgG1 popsaném shora v textu. Gen konstantní oblasti lidského IgG4 se získal jako fragment HindIII-SmaI v M13tg131 a zničilo se restrikční místo HindIII. Mezi 3'koncem exonu CH3 a polyadenylačním místem se objevilo restrikční místo SmaI tak, že polyadenylační místo se porušilo přidáním SmaI fragmentu získaného z vektoru IgG1, který obsahuje DNA, která se nachází mezi ekvivalentem restrikčního místa SmaI v genu IgG1 a restrikčního místa po směru exprese genu v polylinkeru.

Prvním postupem bylo zavedení restrikčního místa XbaI mezi CH1 a exony spojení ramen, restrikčního místa XhoI mezi spojení a exony CH2 a restrikčního místa KpnI mezi exony CH2 a CH3 v pořadí, aby umožnilo výměnu mutovaných sekvencí exonu. To bylo podobné jako manipulace genů IgG1 a IgG4, která se provedla dříve (popisuje se v publikaci Greenwood, J., Clark, M. a Waldmann, H. (1993) Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. Eur. J. Immunol. 23, 1098-1104).

Aby se získala templátové DNA, mikroorganismus *E. coli* RZ1032 se infikoval fágem M13, jak se popisuje shora v textu a připravila se ssDNA. Charakteristika kmene je *dut<sup>-</sup>ung<sup>-</sup>* tak, že produkovaná ssDNA by měla obsahovat nějaký uridin na místě thymidinu.

Oligonukleotidy používané pro zavedení mutací byly:

mezi spojením a exonem CH2

MO10 5'GGA TGC AGG CTA CTC GAG GGC ACC TG 3'

mezi exony CH2 a CH3

MO11 5'TGT CCA TGT GGC CCT GGT ACC CCA CGG GT 3'

mezi CH1 a exony spojení

MO12 5'GAG CCT GCT TCC TCT AGA CAC CCT CCC T 3'

Restrikční místa jsou podtržena.

Oligonukleotidy se fosforylovaly v reakcích o objemu 50  $\mu$ l, které obsahují 25 pmol oligonukleotidu a 5 jednotek T4 polynukleotidové kinázy (nbl) v 70 mM Tris HCl pH7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA, 1 mM ATP. Reakce se inkubovaly při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny a nechaly se zahřát na teplotu 70 °C po dobu 5 minut.

Aby došlo k teplotní hybridizaci mutagenních oligonukleotidů na templátovou DNA, 500 ng DNA obsahující uridin a 1 pmol každého fosforylovaného oligonukleotidu se inkubovalo v 20  $\mu$ l 40 mM Tris HCl pH7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl při teplotě 80 °C po dobu 5 minut a směs se nechala vychladnout pomalu při teplotě 37 °C. Přidal se stejný pufr, přičemž se objem zvýšil na 30  $\mu$ l a přidalo se DTT tak, aby konečná koncentrace byla 7 mM, ATP s konečnou koncentrací 1 mM a dATP, dCTP, dGTP a dTTP, aby konečná koncentrace každého byla 250  $\mu$ M. Přidal se 5 jednotek T7 DNA polymerázy (neupravená, United States Biochemical) a 0,5 jednotek T4 DNA ligázy (Gibco BRL) a reakce se inkubovala při teplotě místnosti po dobu 16 hodin, přičemž se syntetizoval mutantní

řetězec. DNA se srážela v etanolu, rozpustila se v 50  $\mu$ l 20 mM Tris HCl pH8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA a přidala se 1 jednotka uracilové DNA glykosylázy (New England Biolabs). Po inkubaci při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin se přidalo 50  $\mu$ l 400 mM NaOH a reakce se nechala stát při teplotě místnosti po dobu 5 minut, přičemž se vytvořil fragment templátového řetězce DNA. DNA se srážela v etanolu, rozpustila se ve vodě a transformovala se do mikroorganismu *E. coli* TG1. Replikativní forma (RF) DNA se připravila pro selekci výsledných klonů M13. Tyto klony se štěpily, aby se našly klony, které obsahovaly požadovaná restriční místa *XbaI*, *XhoI* a *KpnI*. Vhodné klony se získaly v případě IgG1 a 4 vektory, ale MO12 pravděpodobně teplotně nehybridizoval ve vektoru IgG2. Mutagenese se opakovala v případě IgG2, aniž tento oligonukleotid, jako místo mezi CH1 a exony spojení, nebyl nezbytný pro tento experiment. V případě každého vektoru sekvence DNA exonů se potvrdily sekvenováním.

Změny v CH2 v polohách aminokyselin 327, 330 a 331 (mutace  $\Delta$ a) se zavedly použitím oligonukleotidů:

MO22BACK (kódující kmen):

5'TCT CCA ACA AAG GCC TCC CGT CCT CCA TCG AGA AAA 3'

MO22 (komplementární řetězec):

5'TTT TCT CGA TGG AGG ACG GGA GGC CTT TGT TGG AGA 3'

Změny v CH2 v polohách 233 až 236 (mutace  $\Delta$ b a  $\Delta$ c) se zavedly za použití oligonukleotidů:

MO7BACK (kódující řetězec a kódující mutace  $\Delta$ c):

5'TCC TCA GCA CCT CCA GTC GCG GGG GGA CCG TCA GTC 3'

MO21 (komplementární řetězec a kódující mutace  $\Delta$ b):

5'GAC TGA CGG TCC CGC GAC TGG AGG TGC TGA GGA 3'

Mutace se zavedly extenzí přesahu pomocí PCR, která také vyžaduje oligonukleotidy MO11 a MO10BACK:

5'CAG GTG CCC TCG AGT AGC CTG CAT CC 3'

Restriční místo *XhoI* je podtrženo.

V případě mutace  $\Delta a$  první sada PCR použila jako templáty IgG1 a IgG2 amplifikované s MO22 a MO10BACK a s MO22BACK a MO11. V případě mutací  $\Delta b$  a  $\Delta c$  první sada PCR použila jako templáty IgG1 a IgG2 amplifikované s MO21 a MO10BACK a s MO7BACK a MO11. V konečném produktu DNA pocházející z řetězce, kde se jako primer použil MO21, vykazuje mutaci  $\Delta b$  a ty pocházející z MO22BACK nesou mutaci  $\Delta c$ . Každá reakce PCR obsahovala přibližně 30 ng M13tg131 plus konstantní oblast ssDNA, 25 pmol každého oligonukleotidu a 1 jednotku Pwo DNA polymerázy (Boehringer Mannheim) v 50  $\mu$ l 10 mM Tris HCl, pH 8,85, 25 mM KCl, 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$  a dATG, dCTP, dGTP a dTTP, kdy každý je v koncentraci 250  $\mu$ M. V reakcích se provedla amplifikace ve 14 cyklech při teplotě 94  $^\circ\text{C}$  po dobu 30 vteřin, 50  $^\circ\text{C}$  po dobu 30 vteřin, 72  $^\circ\text{C}$  po dobu 60 vteřin, pak následuje 72  $^\circ\text{C}$  po dobu 5 minut až do konce. Pruhy reprezentující produkt DNA očekávaných velikostí se vyřízl z agarózy tající při nízké teplotě a nechaly se roztát ve 100  $\mu$ l vody. V případě každé mutace se spojily dva počáteční produkty PCR pomocí PCR extenzí překryvu. Přibližně 4  $\mu$ l celých roztavených kousků gelů se smíchalo s 25 pmol každého MO10BACK a MO11 a jinými komponenty popsánymi shora v textu tak, aby počáteční produkty PCR byly v ekvimolárním množství. Provedlo se 18 cyklů PCR, jak se popisuje shora v textu s tou výjimkou, že teplota teplotní hybridizace se snížila z 50  $^\circ\text{C}$  na 48  $^\circ\text{C}$ . Získané produkty, které obsahovaly celý exon CH2, se čistily a štěpily restričními enzymy XhoI a KpnI. DNA RF mutovaných vektorů M13tg131 + konstantní oblast obsahující další restriční místa, jak se popisuje dříve v textu, se štěpily restričními enzymy XhoI a Kpn, aby se odstranil existující DNA CH2 a ligovaly se do ní mutantní oblasti CH2. Vzorky DNA se transformovaly do mikroorganismu *E. coli* TG1. DNA reprezentativních klonů se sekvenovala, aby se identifikovaly správně mutované konstantní oblasti.

Za účelem získat vektory IgG1 s oběma mutanty  $\Delta a$  a  $\Delta b$  nebo  $\Delta c$ , se DNA reprezentující mutant  $\Delta a$  použily jako templát pro druhé kolo PCR, aby se zavedly mutace  $\Delta b$  a  $\Delta c$ , jak se popisuje shora v textu.

IgG1, 2 a 4 divokého typu a mutované geny konstantní oblasti se každý vyřízl z RF DNA v podobě fragmentu *BamHI* - *NotI* a klonovaly se do upraveného vektoru CAMPATH Hu4VH HuIgG1 pDVgpt (Clark, M. R.: Lynxvale Binding Molecule), aby se nahradila existující konstantní oblast. Výsledné vektory se označily jako pSVgptCAMPATHHu4VHHuIgG1 $\Delta a$  atd. Vektor také obsahuje gen *gpt*, aby se umožnila selekce v savčích buňkách, zesilovač těžkého řetězce myšího imunoglobulinu a DNA variabilní oblasti CAMPATH-1 Hu4VH tak, že nese kompletní gen těžkého řetězce, který se může exprimovat v savčích buňkách. Gen humanizovaného lidského řetězce CAMPATH-1 existuje v expresivním vektoru CAMPATH HuVL pSVneo (Reichmann, L., Clark, M. R., Waldmann, H. and Winter, G. (1988) Nature 332, 323-327).

DNA variabilní oblasti Fog1 (popisuje se v publikaci Bye, J. M., Carter, C., Cui, Y., Gorick, B. D., Songsivilai, S., Winter, G., Hughes -Jones, N.C. and Marks, J. D. (1992) Germline Variable Region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rh(D) antibodies. J. Clin. Invest. 90, 2481-2490) se získaly ve vektoru pHEN1. Amplifikovaly se pomocí PCR za použití oligonukleotidů:

FOG1VHBACK	5'TCC ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTG CAT CTA CAG CAG 3'
FOG1VHFOR	5'GAG GTT GTA AGG ACT CAC CTG AGG AGA CGG TGA CCG T 3'
FOG1VKBACK	5'TCC ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG 3'

FOG1VKFOR      5'GAG GTT GTA AGG ACT CAC GTT TGA TCT CCA GCT  
TGG T 3'

Část 5'konce inzertu ve vektoru M13VHPCR1 (Orlandi , R., Gussow, D. H., Jones, P. T. and Winter, G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833) obsahující promotor a DNA kódující signální peptid se amplifikoval za použití univerzálního reverzního primeru M13 a VO3:

5'GGA GTG GAC ACC TGT GGA GA 3'

DNA 3'V<sub>H</sub> v M13VHPCR1 a reprezentující 5'konec V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub> intronu se získal pomocí PCR za použití univerzálního primeru M13 -40 a VO4:

5'GTG AGT CCT TAC AAC CTC TC 3'

Tyto dva fragmenty DNA se spojily postupně s oběma amplifikovanými DNA Fog-1 V<sub>H</sub> a Fog-1 V<sub>K</sub> PCR extenzí přesahu, jak se popisuje shora v textu. Restrikční místo BamHI uvnitř Fog-1 V<sub>H</sub> se deletovalo stejným způsobem za použití oligonukleotidů, které odstranily rozeznávané místo, aniž se mění kódovaná aminokyselina. Úplné produkty PCR se klonovaly do M13mp19 jako fragmenty HindIII-BamHI a potvrdila se jejich sekvence DNA.

Fragment HindIII-BamHI obsahující Fog-1 V<sub>H</sub> se použil při nahrazení fragmentu, který obsahuje CAMPATH-1 V<sub>H</sub> ve vektorech pSVgpt popsáných shora v textu, přičemž vznikají expresivní vektory označené pSVgptFog1VHHuIgG2 atd. V případě vektorů IgG1 další restrikční místo HindIII na 5'konci konstantní oblasti DNA znamená, že není možné jednoduše změnit fragment HindIII-BamHI variabilní oblasti. Místo toho se relevantní vektory pSVgptCAMPATHHu4VHHuIgG1 štěpily restrikčním enzymem HindIII. Linkery, které se navrhly, aby se deletovalo restrikční místo HindIII a přidalo se restrikční místo BamHI, se ligovaly ke štěpenému konci. DNA se pak štěpily restrikčními enzymy BamHI a NotI tak, že se mohly izolovat konstantní oblasti. Fragment HindIII-BamHI obsahující Fog-1 V<sub>K</sub>

se přenesl do vektoru pSVhyg-HuCK (Orlandi et al., 1989), který vždy obsahuje zesilovač těžkého řetězce myšního imunoglobulinu a konstantní oblast lidského genu κ. Výsledný expresivní vektor se nazývá pSVhygFog1VKHuCK.

#### Produkce protilátek

10 µg každého expresivního vektoru těžkého řetězce a 20 µg relevantního expresivního vektoru lehkého řetězce se linearizovalo štěpením pomocí restriktivního enzymu PvuI a vše se kombinovalo v 50 µl vody. Buňky nesekretující buněčné linie krysího myelomu YB2/0 se nechaly růst do dosažení fáze semi-konfluence v modifikovaném Dulbeccově médiu podle Iscove (IMDM) s 5 % fetální bovinní sérum (FBS). Centrifugací se shromáždilo  $10^7$  buněk, které se resuspendovaly v 0,5 ml kultivačního média a přenesly se do kyvety GenePulser (BioRad). Přidala se DNA a směs se inkubovala na ledu po dobu 5 minut. Buňky se podrobily jednomu pulzu o intenzitě 960 µF/170 V a nechaly se na ledu po dobu 15 minut. Pak se umístily do lahve, která obsahuje 20 ml IMDM + 10 % FBS. Lahve se inkubovaly při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> a ve vlhku. Po 24 hodinách se objem zdvojnásobil a kultivační médium se učinilo selektivním přidáním mykofenolové kyseliny v koncentraci 0,8 µg/ml a xanthinu v koncentraci 250 µg/ml. Buňky se rozdělily do alikvotů na dvě plotny s 96 prohlubněmi. Buňky se aplikovaly přibližně 18 dní po selekci, kolonie se zviditelnily a v supernatantech se testovala přítomnost IgG pomocí testu ELISA. Prohlubně mikrotitrační destičky se potáhly kozími anti-lidskými IgG, Fc specifickými protilátkami (Sigma) a pak se inkubovaly s 5 násobným ředěním supernatantů. Vázané protilátky se detekovaly inkubací s kozími anti-lidskými protilátkami konjugovanými s HRPO (Seralab) a test se vyvinul o-fenylendiaminovým substrátem. Buňky z prohlubní

obsahující největší množství protilátek se nechaly kultivovat a zamrazila se zásobní kultura.

Buněčná linie vylučující nejvyšší množství protilátek se nechala kultivovat v 500 ml IMDM + 2 % FBS, přičemž vzniká satureovaný supernatant za účelem čištění protilátek. Supernatant se čistil centrifugací a připravil se roztok 0,1 M Tris HCl pH8,0. Přidala se protein A-agaróza (Sigma) a pak se směs míchala při teplotě 4 °C po dobu 16 hodin. Shromáždily se agarózové částice a nanesly se na kolonu a promyly se 0,1 M Tris HCl pH8,0 a pak 10 mM roztokem Tris HCl pH8,0. Protilátky se eluovaly 1 ml alikvoty 0,1 M glycinu pH3,0 do 100 µl vzorků 1 M Tris HCl pH8,0 a na základě odečítání  $A_{280\text{nm}}$  se identifikovaly frakce obsahující podstatné množství proteinu. Tyto frakce se dialyzovaly proti PBS, sterilizovaly se filtrací a znovu se měřila absorbance při vlnové délce 280 nm, čímž se určí přibližná koncentrace protilátek (koncentrace =  $A_{280\text{ nm}} \times 0,174 \text{ mg/ml}$ ).

Čistota a integrita protilátek se stanovila redukční SDS-PAGE za použití 12,5 % akrylamidu. Koncentrace se kontrolovaly testem ELISA, při kterém se použily kozí anti-lidské κ protilátky (Seralab), jako krycí činidlo a biotinylované kozí anti-lidské κ protilátky (Sigma). Pak následuje detekce za použití ExtrAvidin-HRPO (Sigma). To znamená, že podstata těžkého řetězce pravděpodobně neovlivňuje získané navázání.

Tvorba rozet transfektantů FcγRI.

Promyté R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> RBC se inkubovaly se vzorky protilátek ve 100 ml PBS na plotnách s 96 prohlubněmi při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. RBC se třikrát promyly, resuspendovaly se v PBS a inkubovaly se při teplotě 37 °C po dobu 40 minut s transfektanty, které exprimují cDNA FcγRI, B2KA (popisuje se v publikaci S. Gorman and G. Hale, nepublikovaná data), které

se kultivovaly na plotnách s 96 prohlubněmi. Supernatant se vylil a prohlubně se promyly jednou, aby se odstranil přebytek RBC. V případě každé prohlubně se testovalo 200 buněk B2KA a zaznamenal se počet rozet s RBC. Do grafu se vynesly průměrné hodnoty v procentech a standardní odchylka pro tři prohlubně. V jiném případě senzibilizované buňky RBC a B2KA se smíchaly v mikrocentrifugačních zkumavkách, vytvořil se pelet a buňky se jemně resuspendovaly a pak se přenesly na mikroskopické sklíčko.

#### Fluorescenční barvení transfektantů FcγR

Transfektanti exprimující cDNA FcγRI B2KA a 3T3 + FcγRIa + γ-řetězcem (van Urt, M. J., Heijnen, I. A. F. M., Capel, P. J. A., Park, S. Y., Ra, C., Saito, T., Verbeek, J. S. and van de Winkel, J. G. J. (1996) FcγR γ-chain is essential for both surface expression and function of human FcγRI (CD64) *in vivo*. Blood 87, 3593-3599) se získaly jako suspenze jediné buňky ve fyziologickém roztoku pufovaném fosforečnanem, který obsahuje 0,1 % (hmotn./objem) NaN<sub>3</sub>, 0,1 % (hmotn./objem) BSA (promývací pufr), pak následuje ošetření buněčným disociačním pufrům (Gibco BRL). Vytvořil se pelet buněk, přičemž koncentrace buněk je 10<sup>5</sup> buněk/prohlubeň na destičkách s 96 prohlubněmi. Buňky se resuspendovaly ve 100 μl ředění protilátek CAMPATH-1 nebo Fog-1 a inkubovaly se na ledu po dobu 30 minut. Buňky se promyly třikrát promývacím pufrům, přičemž se použilo 150 μl pufru na jednu prohlubeň a podobně se inkubovaly s kozími anti-lidskými protilátkami κ-řetězce konjugovanými s biotinem (Sigma) v koncentraci 20 μg/ml a pak s 20 μg/ml ExtrAvidin - FITC (Sigma). Po konečném promytí se buňky zafixovaly ve 100 μl promývacího pufru, který obsahuje 1% (objem/objem) formaldehydu. Povrchová exprese FcγRI se potvrdila barvením monoklonálními protilátkami CD64 (Serotec) a kozími a myšími

IgG protilátkami konjugovanými s FITC (Sigma). Intenzita fluorescence se měřila na zařízení FACScan (Becton Dickinson).

V případě transfektantů, které nesou FcγRII, 3T6 + FcγRIIa 131H/H, 3T6 + FcγRIIa 131R/R (Warmerdam, P. A. M., van de Winkel, J. G. J., Gosselin, E. J., and Capel, P. J. A. (1990) Molecular basis for a polymorphism of human Fcγ receptor II (CD32). *J. Exp. Med.* 172, 19-25, Warmerdam, P. A. M., van de Winkel, J. G. J., Vlug, A., Westerdaal, N. A. C. and Capel, P. J. A. (1991) A single aminoacid in the second Ig-like domain of human Fcγ receptor II is critical for human IgG2 binding. *J. Immunol.* 147, 1338-1343) a 3T6 + FcγRIIb1\* (Warmerdam, P. A. M., van den Herik-Oudijk, I. E., Parren, P. W. H. I., Westerdaal, N. A. C., van de Winkel, J. G. J. and Capel, P. J. A. (1993) *Int. Immunol.* 5, 239-247) před tím, než se protilátky inkubovaly s buňkami a tvořily komplexy. Například protilátky FcγRIIa 131H/H se míchaly s ekvimolárním množstvím kozích F(ab')<sub>2</sub> anti-lidských κ (Seralab) a inkubovaly se při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Komplexy se pak smíchaly s buňkami a test pak pokračoval způsobem, jak se popisuje shora v textu s výjimkou, že detekční protilátky byly oslí anti-kozí IgG konjugované s FITC (Serotec). V případě FcγRIIa 131R/R se komplexy připravily za použití ekvimolárního množství kozích F(ab')<sub>2</sub> anti-lidských κ (Seralab) konjugovaných s FITC a v případě FcγRIIb1\* se komplexy připravily za použití ekvimolárního množství 1:1 směsi kozích F(ab')<sub>2</sub> anti-lidských κ konjugovaných s FITC nebo neznačených. V případě těchto receptorů byl potřeba pouze jeden krok inkubace.

V případě transfektantů, které nesou FcγRIIIb, CHO + FcγRIIb1 NA1 nebo NA2 (popisuje se v publikaci Bux, J., Kissel, K., Hofmann, C. and Santoso, S. (1999) The use of allele-specific recombinant Fc gamma receptor IIIb antigens for the

detection of granulocyte antibodies. Blood 93, 357-362), se barvení provedlo způsobem, který se popisuje v případě buněk 3T6 + FcγRIIa 131 H/H, jak se popisuje shora v textu.

#### Senzibilizace červených krvinek

Skupina O R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> RBC se promyla v PBS a resuspendovala se v RPMI + 10 % FBS, přičemž konečná koncentrace je 5% (objem/objem). 10 μl buněk se přidalo do 50 μl monoklonálních protilátek nebo RPMI/FBS, které jsou umístěny na destičkách s prohlubněmi, které mají dno ve tvaru písmene V, a inkubovaly se po dobu 60 minut při teplotě 37 °C. V některých experimentech se monoklonální protilátky sériově naředily v RPMI/FBS, přičemž se dosáhlo rozmezí červených krvinek vázaných na IgG. V kompetičních experimentech se červené krvinky senzibilizovaly ve směsi 25 μl kompetičních monoklonálních protilátek a 25 μl monoklonálních protilátek divokého typu nebo 25 μl séra, které obsahuje aloproutilátky. Po senzibilizaci se buňky promyly 4 krát 200 μl PBS a resuspendovaly se v 50 μl RPMI/FBS (konečná koncentrace je 1 % (objem/objem)). Ve všech experimentech se alikvot buněk (E-IgG) testoval pomocí průtokové cytometrie, přičemž se stanovila úroveň IgG vázaných na červené krvinky.

#### Chemoluminiscenční test

PBMC se izolovaly centrifugací s hustotním gradientem z EDTA-antikoagulované krve, která se získala z 6 normálních dárců. PBMC se promyly 4 krát PBS, které obsahují 1 % BSA bez globulinu a pak se resuspendovaly v Hankově rovnovážném roztoku solí (HBSS) obsahujícím 25 % RPMI a 2,5 % FBS v koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml. Alikvoty (100 μl) se rozdělily do 96 bílých matných destiček s plochým dnem a inkubovaly se po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C ve vlhku v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>

ve vzduchu. Destičky se pak umístily do luminometru (Anthos Lucy 1, Labtech International, Uckfield, UK) a 100  $\mu$ l HBSS obsahující  $4 \times 10^{-4}$  M luminol (Sigma) a do každé prohlubně se přidalo 20  $\mu$ l E-IgG. Odezva CL se pak monitorovala při teplotě 37 °C po dobu 60 minut.

Stanovení IgG vázaných na červených krvinkách

Alikvoty 25  $\mu$ l E-IgG se přenesly na destičku s prohlubněmi se dnem do tvaru V, promyly se jednou PBS, centrifugovaly se za vzniku peletu a resuspendovaly se v 50  $\mu$ l F(ab)<sub>2</sub> FITC-anti-IgG (ředěných 1/30 v PBS/1% BSA). Po 30 minutách při teplotě místnosti se buňky promyly jednou 200  $\mu$ l PBS/BSA a držely se na ledu až do další analýzy průtokovou cytometrií (EPICS XL-MCL, Coulter Electronics, Luton, UK). Zaznamenal se průměrný profil fluorescence.

Průměrný profil fluorescence se převedl na molekuly IgG/buňku za použití standardní křivky, která se připravila přidáním 100  $\mu$ l 5% (objem/objem) buněk R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> do 900  $\mu$ l seriového dvojnásobného ředění lidských monoklonálních IgG1 anti-D (BRAD-5). Senzibilizované červené krvinky se promyly 3 krát s PBS/BSA a resuspendovaly se v roztoku PBS/BSA na koncentraci 1 % (objem/objem). Odebraly se alikvoty o objemu 25  $\mu$ l a analyzovaly se průtokovou cytometrií, jak se popisuje shora v textu. Spočítaly se zbývající červené krvinky, centrifugací se připravil pelet, lyzovaly se v pufru, který obsahuje Triton X-100 a v lyzátu se testem ELISA stanovilo IgG, jak se popisuje v publikaci Kumpel, B. M. (1990). A simple non-isotopic method for the quantitation of red cell-bound immunoglobulin. *Vox Sanguinis*, 59, 34-39). Počet molekul IgG vázaných na jednu červenou krevinku se dedukoval z koncentrace IgG a počtu červených krvinek, ze kterého se připravil každý lyzáat. Do grafu se vynesla standardní křivka porovnávací

intenzitu fluorescence s počtem molekul IgG vázaných na jednu červenou krvinku.

Komplementární lyze zprostředkovaná sérií protilátek CAMPATH-1

100 ml venózní krve získané ze zdravých dobrovolníků se defibrinovalo a separovaly se komponenty centrifugací s hustotním gradientem za použití Ficoll-Paque Plus (Pharmacia). Do zkumavek se odebralo sérum a mononukleární buněčné vrstvy. Buňky se ředily v Dulbeccově kultivačním médiu upraveném podle Iscove (IMDM) a shromáždily se centrifugací. Buňky se dvakrát promyly v IMDM, zatímco se kombinovaly do jednoho peletu, který se resuspendoval v 200  $\mu$ l IMDM. Přidalo se 900  $\mu$ Ci chromanu sodného [ $^{51}\text{Cr}$ ] a buňky se inkubovaly při teplotě 37 °C po dobu 40 minut. Přidalo se 10 ml kultivačního média IMDM a vytvořil se pelet buněk. Buňky se promyly dvakrát a resuspendovaly se v kultivačním médiu IMDM při přibližné koncentraci  $6 \times 10^6$  buněk/ml. Alikvoty značených buněk o objemu 50  $\mu$ l se přidaly ke vzorkům protilátek na destičky s 96 prohlubněmi, které obsahují 50  $\mu$ l kultivačního média IMDM. Do každé prohlubně se přidalo 100  $\mu$ l zbývajících séra ředěného 1:1 s IMDM a plotny se inkubovaly při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Destičky se centrifugovaly a supernatanty se rozdělily do vzorků a měřilo se relativní množství uvolněného  $^{51}\text{Cr}$  gamma-počítačem. Odečetla se míra spontálního uvolnění dosažená ze vzorků, kam se nepřidaly protilátky, a míra celkového množství dostupného  $^{51}\text{Cr}$  získaná ze stejných vzorků odebraných po resuspendování buněk. % specifického uvolněného  $^{51}\text{Cr}$  se vypočítala podle vzorce:

$$\frac{(\text{impulzy vzorku} - \text{spontální impulzy}) \times 100}{(\text{celkové impulzy} - \text{spontální impulzy})}$$

Do grafu se vynesly průměrné hodnoty a standardní odchylky tří vzorků.

V případě inhibice komplementární lyze vzorky protilátek obsahovaly konstantní množství (konečná koncentrace 6,25 µg/ml) CAMPATH-1 G1 a zvyšující se množství CAMPATH-1 G2Δa.

ADCC zprostředkovaná sérií protilátek CAMPATH-1

Mononukleární buňky periferní krve se připravily způsobem, který se popisuje shora v textu. Po promytí se buňky resuspendovaly v kultivačním médiu doplněném 5 % FBS a přenesly se do lahví, které se potáhly protilátkami CD3. Buňky se nechaly kultivovat při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> po dobu tří dní. 5 % buněk se značilo <sup>51</sup>Cr a použily se jako cílové buňky, promyly se a resuspendovaly se v kultivačním médiu IMDM + 5 % FBS. Do prohlubní na destičkách se přidaly alikvoty o objemu 50 µl obsahující 50 µl vzorků protilátek v IMDM + 5 % FBS. Cílové buňky a protilátky se inkubovaly při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Jako nosič se přidaly RBC a vytvořil se centrifugací pelet buněk. Buňky se promyly dvakrát v kultivačním médiu IMDM. Zbývající mononukleární buňky se sebraly centrifugací a resuspendovaly se v kultivačním médiu IMDM + 5 % FBS, aby jejich koncentrace byla 4 x 10<sup>6</sup> buněk/ml, a přidalo se do každé prohlubně 150 µl suspenze buněk. Poměr efektor:cíl je 20:1. Buňky se jemně centrifugovaly a umístily se do inkubátoru tkáňových kultur po dobu 6 hodin. Supernatanty se rozdělily do vzorků a stanovilo se specifické uvolnění <sup>51</sup>Cr, jak se popisuje shora v textu. Do grafu se vynesly průměrné hodnoty specifického uvolnění pro dva vzorky proti konečným koncentracím protilátek.

Příklad 1: Vytvoření a základní charakterizace protilátek

Mutace vybrané za účelem eliminovat efektorové funkce, jsou zobrazeny v tabulce č. 1 (obrázek č. 15). Mutace  $\Delta a$  provedená v genech IgG1 a IgG2 zavedla zbytky IgG4 do poloh 327, 330 a 331. Podobně zbytky IgG2 v polohách 233-236 se zavedly do IgG1 a IgG4, ale protože IgG2 vykazují delece v poloze 236, kde jiné podtřídy mají glycinový zbytek, mutace se provedla vynecháním ( $\Delta b$ ) nebo zahrnutím ( $\Delta c$ ) G236.

Vektory umožňující expresi DNA CAMPATH-1 nebo Fog-1  $V_H$  v kombinaci s konstantními oblastmi mutantních genů DNA se ko-transfekovaly s vhodnými expresivními vektory lehkého řetězce do buněk krysího myelomu.

Izolovaly se stabilní transfektanty, nechaly se pomnožit a protilátky se čistily ze supernatantu na agaróze s proteinem A.

Vybraly se protilátky CAMPATH-1H, protože poskytují dobrý cílový systém při studii lyze sprostředkované komplementem a buňkou *in vitro*.

V případě protilátek Fog-1 se po čištění vytvořila sraženina, ale v okamžiku, kdy se odstranila filtrací, tak se už nezaznamenala další sraženina. Koncentrace protilátek se stanovily na základě absorbance při vlnové délce 280 nm a upravila se, jestliže je to nutné, testem ELISA, který udává relativní množství přítomného řetězce  $\kappa$ . Protilátky se vystavily redukční SDS-PAGE. Každý vzorek vykazuje dva pruhy s vhodnou molekulovou hmotností 25 000 a 55 000, který reprezentuje očekávané velikosti lehkého a těžkého řetězce. Neexistuje poznatelný rozdíl mezi velikostmi těžkých řetězců každé série protilátek, ale oba řetězce protilátek Fog-1 se jeví být o trochu menší než jejich doplňky CAMPATH-1. Skutečnost, že těžký řetězec se v každé sérii jeví tak, že má stejnou zjevnou molekulovou hmotnost indikuje, že mutace

nezpůsobují žádné velké rozdíly v glykosylaci proteinů. V případě protilátek se specifitou CAMPATH-1 výtěžek po čištění kolísá od 0,6 do 9  $\mu\text{g/ml}$  supernatantu, zatímco výtěžek rozpustných protilátek Fog.1 se pohybuje mezi hodnotou 3 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Neexistuje žádná korelace při hodnocení výtěžku čištění pro dvě série protilátek, které naznačují, že žádné mutace neovlivňují produkci protilátek nebo jejich schopnost vázat protein A.

Pak se testovala specifita dvou sérií protilátek. Protilátky CAMPATH-1 ukazuje, že soutěží s klinickým stupněm čistoty protilátek CAMPATH-1H při navázání anti-CAMPATH-1 idiotypu monoklonálních protilátek YID13.9. Protilátky Fog-1 byly schopny aglutinovat  $\text{RhD}^+$  RBC v přítomnosti anti-lidských IgG protilátek jako zkříženě reagující činidla. Podobně podtřída IgG protilátek Fog1 se testovaly potažením  $\text{RhD}^+$  RBC s různými protilátkami a při prohlížení aglutinačního paternu se jako zkříženě reagující protilátky použily protilátky anti-Glm(a), anti-IgG2 nebo anti-IgG4. Výsledek indikuje, že protilátky byly protilátky upravené podtřidy. Aglutinace  $\text{RhD}^+$  RBC pomocí Fog-1 IgG1 a anti-Glm(a), Fog-1 IgG2 a anti-IgG2 a Fog-1 IgG4 a anti-IgG4 se provedla v přítomnosti nadbytku protilátek ze série CAMPATH-1. Protilátky CAMPATH-1 jsou schopny inhibovat aglutinaci tím, že soutěží se zkříženě reagujícím činidlem. Pouze v případě, že pocházejí ze stejné podtřidy jako protilátky Fog-1, tak ověřují svou podtřidu.

#### Příklad 2: Navázání Fc $\gamma$ RI

RBC, které obsahují přibližně 30 000  $\text{RhD}$  míst na jedné buňce ( $\text{R}_2\text{R}_2$ ), se potáhly každou z 11 protilátek Fog-1 v celém rozhraní koncentrací a přidaly se k lidským transfektantům B2KA, které exprimují lidský Fc $\gamma$ RI a rostou v prohlubních. Po inkubaci se odstranil nadbytek RBC a zaznamenaly se procenta

buněk B2KA , které tvoří rozety pomocí RBC (obrázek č. 1). V případě G1 a G1Δa, kde zbytky IgG4 jsou zahrnuty v polohách 327, 330 a 331 se dosáhlo podobného množství rozet, přičemž polovičního množství rozet se dosáhlo, když RBC se potáhlo protilátkami v přibližné koncentraci 0,1 μg/ml, což je koncentrace, při které se očekává, že protilátky Fog-1 obsadily přibližně jednu třetinu míst RhD. Slabě vyšší koncentrace G4 jsou nutné pro získání stejného množství rozet. Když se použily RBC potažené protilátkami G1 a G4, které obsahují mutace Δa a Δc, nebo protilátkami G2. V experimentu zobrazeném na obrázku č. 1 nejvyšší testovaná koncentrace potažení byla 10 mg/ml. Očekává se, že tato koncentrace odpovídá přibližně 90 % obsazení míst RhD. Experiment se opakoval za použití potahovacích koncentrací až 80 mg/ml, což v podstatě saturuje místa RhD a v případě protilátek G2 a protilátek, které obsahují mutace Db nebo Dc a těch, které začleňují zbytky IgG2 v nižších oblastech spojení, se neobjevily žádné rozety. To indikuje, že dokonce když se RBC potáhly těmito protilátkami při maximální hustotě uvedeného antigenu, nedošlo k dostatečné interakci IgG/FcγRI pro vytvoření rozet.

Společnou centrifugací senzibilizovaných buněk RBC a B2KA dříve než se pozorovaly rozety na mikroskopickém sklíčku se zjistilo, že vyšší poměr rozet vzniká, když se buňky inkubují v prohlubních. Tato metoda se použila při zkoumání inhibice tvoření rozet. Dříve než se R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> RBC smíchaly s buňkami B2KA potáhly se směsí 1 mg/ml protilátek Fog-1 a různého množství Fog-1 G2Da nebo Fog-1 G4Db. Když se použily samotné protilátky Fog-1 G1 v koncentraci 1 μg/ml, potažené RBC vytvořily rozety na 95 % buněk B2KA, zatímco při senzibilizaci v přítomnosti 64mg/ml G2Δa nebo G2Δb nedochází k žádné tvorbě rozet (data nejsou uvedena).

Navázání protilátek z obou serií na dvě různé buněčné linie, které na svém povrchu exprimují cDNA Fc $\gamma$ RI, se měřila fluorescenčním barvením. Na obrázku č. 2 jsou zobrazeny reprezentativní experimenty. Množství Fc $\gamma$ RI exprimovaném na povrchu, jak se detekuje za použití protilátek CD64 je vyšší v případě transfektantů 3T3 než v případě linie B2KA a to se odráží v silnějším signálu získaném, když se měří navázání prostřednictvím Fc. V případě obou serií se protilátky G1 a G1 $\Delta$ a vázané na receptor se stejnou zjevnou afinitou indikující, že mutace v polohách 327, 330 a 331 podstatně neovlivňují interakci. Navázání protilátek G4 je přibližně tři násobně nižší než navázání protilátek G1 a G1 $\Delta$ a. Slabé navázání je možné spatřit v případě protilátek G2 nebo libovolných jiných mutovaných protilátek, což naznačuje, že mutace  $\Delta$ b a  $\Delta$ c u IgG1 a IgG4 jsou dostatečné pro redukci navázání na Fc $\gamma$ RI alespoň  $10^4$ -násobně. Protilátky obsahující mutaci  $\Delta$ c zvláště pak G1 $\Delta$ c vykazují nízký stupeň navázání na Fc $\gamma$ RII při testovaných vyšších koncentracích, jestliže síla fluorescence se porovnává s pozadím nebo s ekvivalentními protilátkami s mutací  $\Delta$ b. Jestliže histogramy intenzity fluorescence jsou přelity, jak je možné spatřit na obrázku č. 3 v případě nejvyšších koncentrací protilátek CAMPATH-1 a buněk B2KA, grafy v případě protilátek G1 a G1 $\Delta$ a se shodují. Existuje zde jasný rozdíl mezi histogramy v případě protilátek G1 $\Delta$ b a G1 $\Delta$ c.

### Příklad 3: Spuštění Fc $\gamma$ RI měřené fluorescencí

Za účelem měření funkční aktivity prostřednictvím Fc $\gamma$ RI/II se stanovila chemoluminiscenční odezva (CL) monocytů na RBC senzibilizované protilátkami ze série Fog-1. Hodnoty se vynesly do grafu a vztáhly se k počtu molekul protilátek vázaných na RBC (obrázek č. 4). Rozdíl mezi protilátkami G1 a

G1Δa je možné vidět u vyššího množství protilátek, ale v případě obou protilátek se projeví vyšší odezvy než v případě protilátek G4 v celém rozmezí použitých koncentrací. Podstatné spuštění se dosáhlo u protilátek G1Δc a v menším rozsahu u protilátek G1Δa a G4Δc. U dalších protilátek se neprokázala žádná odezva.

Protílátky, o kterých se ví, že jsou deficitní při spuštění FcγRI se smíchaly ve zvýšených koncentracích s konstantním množstvím Fog-1 G1 a použily se k senzibilizaci RBC. Odezva CL na RBC je zobrazena na obrázku č. 5. Porovnáním odezvy CL s odezvou získanou titrací samotných G1 ukazuje, že šest protilátek ze sedmi inhibuje reakci v předpovídaném rozsahu, jestliže se předpokládá, že mutanti vykazují aktivní protílátku G1 z RBC úměrnou k jejich relativní koncentraci. V případě G2 se inhibiční účinek oddálil a proto je třeba třikrát více protilátek G2, aby došlo ke stejné inhibici. Protílátky G1Δc inhibují přibližně ve stejném rozsahu jako jiné mutované protílátky s výjimkou, že odezva není snížena na 0.

Existují dvě publikace, kde se popisuje použitelnost chemoluminiscence při předpovídání vážnosti patologie in vivo. Jsou to publikace Hadley (1995) Transfusion Medicine Reviews 9: 302-313 a Hadley et al (1988) Br. J. Obstet Gynaecol 105: 231-234.

V těchto testech výsledných přibližně 30 % chemoluminiscence produkované monoklonální protílátkovou kontrolou BRAD-5 bude předpovídat in vivo patologii u HDN. Tak tyto protílátky, které budou držet zmíněné množství pod 30 %, by měly být vhodné pro terapii.

Jedny z mutovaných protilátek Fog-1 G2Δa se testovaly za účelem zjištění jejich schopnosti inhibovat odezvu CL na

sérum, které obsahuje klinicky podstatné množství protilátek. Sera obsahovaly proti-látky anti-RhD nebo antiC+D a v nepřítomnosti inhibitoru došlo k CL odezvě vyšší než 30 %, což ukazuje na těžké hemolytické onemocnění novorozence a nutnost aplikace nitroděložní transfúze. Séra se smíchala s různými koncentracemi protilátek G2 $\Delta$ a, přičemž směsy se použily k senzibilizaci RBC a stanovily se odezvy monocytů (obrázek č. 6). Přidáním protilátek G2 $\Delta$ a se redukuje signály CL, což způsobuje, že všech pět anti-RhD sér vykazuje hodnotu pod 30 %. Aby se dosáhlo této hodnoty je nutné přidat 16 až 260  $\mu$ g/ml protilátek, přičemž rozmezí odráží různé množství a afinity protilátek anti-RhD v séru. Existují dvě kontrolní séra. Anti-K sérum se nemůže blokovat vůbec protilátkami G2 $\Delta$ a, protože jeho reaktivita se směřuje k jinému antigenu na RBC. Pouze část aktivity anti-C+D séra se může inhibovat protilátkami G2 $\Delta$ a.

#### Příklad 4: Aktivita při lyzi komplementem

Na obrázku č. 7 je zobrazeno, že všechny mutace připravené za použití protilátek G1 a G2 CAMPATH-1 dramaticky snižují jejich schopnost zprostředkovat komplementární lyzi. Když se provedl test za použití konstantního množství protilátek G1 a různého množství protilátek G2 $\Delta$ a (zobrazeno na obrázku č. 8), protilátky G2 $\Delta$ a jsou schopny blokovat odumírání PBMC zprostředkované CAMPATH-1 G1.

#### Příklad 5: Aktivita při ADCC

Schopnost zprostředkovat ADCC se měřila v případě protilátek CAMPATH-1 za použití lidských PBMC jako cílových buněk (zobrazeno na obrázku č. 9) a v případě protilátek Fog-1 za použití RhD<sup>+</sup> RBC jako cílových buněk (obrázky č. 10 a 10b). Obrázek č. 9 ukazuje smíšené schopnosti protilátek CAMPATH-1

při ADCC za použití stejných mutantů, které mají velmi nízkou aktivitu. Obrázky 10 a 10b ukazují, že mutanti G1 $\Delta$ ab, G1 $\Delta$ ac, G2 $\Delta$ a, G4 $\Delta$ b a G4 $\Delta$ c protilátek Fog-1 jsou schopny podpořit libovolné odumírání RBC. Na obrázku č. 10 je možné spatřit lyzi RBC senzibilizovaných protilátkami G2 nebo G4, ale uvedené protilátky nevykazují zjevnou aktivitu v testu zobrazeném na obrázku č. 10b. Tuto skutečnost demonstruje pozorování, že stupeň lyze může záležet na donoru efektorových buněk a může dokonce kolísat, když se použijí efektorové buňky, které se získají od stejného dárce v různém čase. V případě mutantů uvedených shora v textu se nezjistila žádná aktivita na úrovni pozadí, ačkoli se testovalo velké rozpětí efektorových dárců.

Některé protilátky se použily při pokusu inhibovat ADCC RhD<sup>+</sup> RBC pomocí Fog-1 G1 (zobrazeno na obrázcích č. 11 a 11b) a klinickým vzorkem anti-RhD séra (zobrazeno na obrázku č. 12). Uvedené obrázky ukázaly, že všechny testované protilátky jsou schopny inhibovat ADCC, když se smíchaly s aktivními protilátkami dříve než se provede senzibilizace RBC. Zvláště účinné při blokování ADCC jsou mutanti G1 $\Delta$ ab, G1 $\Delta$ ac, G2 $\Delta$ a, G4 $\Delta$ b a G4 $\Delta$ c protilátek Fog-1.

#### Příklad 6: Navázání Fc $\gamma$ RI

Obrázky 13, 13b a 14 zobrazují navázání komplexů protilátek ze série Fog-1 na buňky nesoucí Fc $\gamma$ RIIa 131H/H, Fc $\gamma$ RIIa 131R/R a Fc $\gamma$ RIIb1\*. Je nezbytné tvořit komplexy protilátek v případě, že se měří navázání na tyto receptory, což způsobuje jejich slabou afinitu pro jednotlivé molekuly protilátek. Fc $\gamma$ RIIa 131H/H je alotyp Fc $\gamma$ RIIa, u kterého se očekává, že se na něj protilátky vážou silně a G1 a G2 vykazují silnou vazebnou aktivitu (obrázek č. 13). Zavedení mutací těchto dvou protilátek dochází k postupné redukci

v úrovni navázání a protilátky G1Δac vykazují pouze úroveň navázání odpovídající pozadí, jaké vykazují protilátky G4. Obrázek č. 13b ukazuje, že protilátky mají odlišné relativní aktivity, když se váží na 131R alotyp FcγRIIa, ale mutace vytvořené s protilátkami G1 divokého typu opět snižují navázání na receptor. Všechny protilátky vykazují podstatně vyšší navázání na inhibiční receptor FcγRIIb\* ve srovnání s negativními kontrolními vzorky zkříženého navázání samotného F(ab')<sub>2</sub> nebo glykosylovaných protilátek IgG1 v komplexu s F(ab')<sub>2</sub> (zobrazeno na obrázku č. 14). Ačkoli navázání většiny mutantů se snižuje relativně s odpovídajícími protilátkami divokého typu, některé mutanty vykazují dvojnásobek navázání ve srovnání s protilátkami G1 divokého typu.

#### Příklad 6b: Navázání FcγRIII

Na obrázku 14b a 14c je znázorněno navázání komplexů protilátek ze serií Fog-1 na buňky nesoucí FcγRIIb alotypů NA1 a NA2. V případě obou alotypů je možné pozorovat navázání v případě protilátek G1 a v menším rozsahu v případě protilátek G1Δa a G1Δc. V případě jiných mutovaných protilátek se nepozorovalo žádné navázání, protože vykazují podobnou sílu fluorescence jako negativní kontrolní vzorky zkříženě reagujícího samotného F(ab')<sub>2</sub> nebo glykosylovaných protilátek IgG1 tvořících komplex s F(ab')<sub>2</sub>.

#### Příklad 7: Produkce anti-G1Δa-HPA-1a protilátek

Amplifikovaly se oblasti V<sub>H</sub> a V<sub>λ</sub> protilátek anti-HPA-1a scFv (Griffin, H. M. and Ouwehand, W. H. (1995) A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 form of the platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. Blood 86, 4430-4436) a každá se připojila na vedoucí sekvenci, která pochází z vektoru M13VHPCR1 (popisuje se

v publikaci Orlandi, R., Gussow, D. H., Jones, P. T. and Winter, G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833) PCR prodlužující přesah, jak se popisuje dříve v textu. DNA 3'konec  $V_H$  v M13VHPCR1 a reprezentující 5'konec intronu  $V_H-C_H$  se podobně spojil s vedoucí sekvencí/ $V_H$ DNA. Produkt se klonoval jako HindIII-BamHI fragment do expresivního vektoru IgG1 a IgG2, aby se nahradila existující variabilní oblast fragmentu a vznikly vektory pSVgptB2VHHuIgG1 a pSVgptB2VHHuIgG2.

Vedoucí sekvence/ $V\lambda$  DNA se spojila do rámce s DNA konstantní oblasti lidského řetězce  $\lambda$  alotypu Kern $\bar{Oz}^-$  (popisuje se v publikaci Rabbitts, T. H. Forster, H. and Matthews, J. G. 1983. Mol. Biol. Med. 1:11) získané z existujícího expresivního vektoru (popisuje se v publikaci Routledge, E. G., Lloyd, I, Gorman, S.D., Clark, M. and Waldmann, H. 1991, Eur. J. Immunol. 21: 2717). Celý gen  $\lambda$  se klonoval do M13 jako HindIII-BamHI fragment a zesilovač myšího těžkého řetězce z pSVhyg-HuCK (popisuje se v publikaci Orlandi, R., Gussow, D. H., Jones, P. T. and Winter, G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833) na 5'konec genu za použití adapterů tak, že celý inzert by se mohl přenést do pSV2neo (popisuje se v publikaci Southern, P. J. and Berg P. 1982 J. Mol. Appl. Genet. 1:327) jako fragment BamHI. Vektor se označil jako pSVneoB2V $\lambda$ HuCl.

Expresivní vektory se transfekovaly do buněčné linie krysího myelomu YB2/0, přičemž se vybraly transfektanty a čistily se protilátky, jak se popisuje shora v textu. Tyto protilátky B2IgG1 a B2IgG2 se mohou použít jako kontrolní protilátky.

Když se vybrala preferovaná nulová konstantní oblast fragment B2 VH HindIII-BamHI, může se zavést do expresivních vektorů, které nesou vhodné konstantní oblasti genů, které nahrazují existující fragment variabilní oblasti. Expresivní

vektory těžkého řetězce se pak společně transfekovaly s pSVneoB2VλHuCl do buněk myelomu a protilátky se čistily za účelem použití.

#### Příklad 8: Terapeutické použití vazebné molekuly

Terapeutická molekula podle vynálezu se může použít při léčbě těhotenství komplikovaných aloimunizací HPA-1a, například intravenózní aplikací matce, přičemž tato léčba závisí na přenosu placentou (například prostřednictvím FcRn), aby se dostala terapeutická dávka k zárodku.

Alternativní způsob je přímá aplikace zárodku do perkutánní umbilikální žíly. Tento postup se v současné době provádí v případě FAIT, aby se transfuzí zavedly kompatibilní krevní destičky. Během jednoho těhotenství se postup může mnohokrát opakovat. Existuje zde nebezpečí ztráty plodu vyjádřeno v procentech 0,5 % při jednom provedení.

Fetální aplikace terapeutických protilátek má však tu výhodu, že velmi snižuje potřebnou dávku a proto je možné zvažovat jako první krok terapie použití molekul podle vynálezu ve spojení s transfúzí krevních destiček. Tento přístup může před zavedením omezit nebo eliminovat nutnost dalších transfúzí krevních destiček.

#### Shrnutí

Aktivity protilátek jsou shrnuty v tabulce č. 2 (obrázek č. 16). Jak je možné vidět mohou se produkovat vazebné molekuly, které mají sníženou schopnost vázat se na FcγRI, FcγRIIa 131H/H, FcγRIIa 131R/R, FcγRIIb NA1 a FcγRIIb NA2. Tyto látky nejsou schopné vyvolat u monocytů chemoluminiscenci, nemohou zprostředkovat komplementární lyzi a nejsou proto aktivní při ADCC. Vazebné molekuly se však uchovávají

schopnost vázat se na inhibiční receptor FcγRIIb. Jiné mutace, které se dříve používaly při odstranění efektorových funkcí, jako je odstranění glykosylačních míst v oblasti CH2, aby vznikly glykosylované protilátky mohou také eliminovat navázání na tento receptor, který nemusí být nutný.

Ukázalo se, že vybraní mutanti jsou schopni zcela inhibovat tvoření rozet u buněk nesoucích FcγRI pomocí protilátek Fog-1, odezvu monocytů na RBC senzibilizované protilátkami Fog-1 G1, odezvu monocytů na RBC senzibilizované anti-RhD, usmrcení PBMC komplementární lyzí s CAMPATH-1 G1, usmrcení RBC pomocí ADCC s protilátkami Fog-1 G1, usmrcení RBC pomocí ADCC s polyklonálním anti-RhD sérem.

Zde uvedené výsledky ukazují, že úprava pouze jediného zbytku v oblasti IgG CH2, aby odpovídala s odlišnou podtřídou může vést k odlišné aktivitě. Tak je tomu v případě tří párů mutantů Db a Dc: G1Δb a G1Δc, G1Δab a G1Δac, G4Δb a G4Δc. V každém páru se protilátky liší pouze absencí (Δb) nebo přítomností (Δc) G236. V případě většiny zde měřených funkcí protilátky Δb a Δc mají různé aktivity. Mutanti Db jsou více aktivní při navázání FcγRIIa 131H/H, zatímco mutanti Dc jsou více aktivní při navázání FcγRI, FcγRIIb NA1 a NA2, při aktivaci monocytů a ADCC. Oblast, kde se připravily mutace Δb a Δc je známa jako spodní část spojení a je pravděpodobné, že vykazuje rozsáhlou strukturu spojující spojení řetězců se zbývající doménou CH2. Adice nebo delece zbytku z této oblasti podle předpokladu mění uspořádání zbytků nižšího spojení vztaženo k receptorovým interakčním místům ve zbytku oblasti CH2.

Je nutné poznamenat, že účinek mutací se nemůže vždy předpovědět na základě aktivit protilátek divokého typu, ale bude záviset na novém obsahu (založeno na „smíšených

podtřídách IgG"), ve kterých jsou přítomny mutace. Jedním příkladem je test komplementární lyze, kde aktivity IgG2 jsou přibližně třikrát nižší než aktivity IgG1, ale zavedení zbytků IgG2 do IgG1 (G1Δb a G1Δc) eliminuje lyzi. Podobně IgG1 a IgG2 vykazuje stejné navázání jako FcγRIIa 131H, ale aktivity protilátek G1Δb a G1Δc jsou 50-ti a 10-ti násobně nižší. V případě testů ADCC, jak se uvádí na obrázku č. 9 a 10, vykazují IgG2 a IgG4 podobnou, nižší, ale měřitelnou míru lyze. Substitucí zbytků mezi IgG2 a IgG4 stejně jako do IgG1 se redukuje jejich aktivita. Data naznačují, že protilátky divokého typu různých podtříd lidského IgG a podle předpokladu mutované protilátky mohou použít různé zbytky při navázání na jiné molekuly, přičemž spustí jejich aktivitu.

## P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Vazebná molekula, která je rekombinantním polypeptidem obsahujícím:
  - i) vazebnou doménu schopnou vázat cílovou molekulu a
  - ii) efektorovou doménu, která má aminokyselinovou sekvenci v podstatě homologní s celou nebo s částí konstantní oblasti těžkého řetězce lidského imunoglobulinu,kde vazebná molekula je schopna vázat cílovou molekulu, aniž spustí podstatnou lyzi závislou na komplementu nebo poškození cíle zprostředkované buňkou, přičemž je charakterizována tím, že efektorová oblast je schopná specificky vázat FcRn a/nebo FcγRIIb a že chimerová efektorová oblast, která se získala ze dvou nebo více oblastí C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, které zahrnují jako první oblast C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, kde 2, 3 nebo 4 aminokyseliny alespoň v jedné oblasti C<sub>H</sub>2 se upravily tak, že odpovídají aminokyselinám z druhé, odlišné oblasti C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, přičemž oblast se vybrala ze dvou diskrétních oblastí zbytků s čísly 233 až 236 a 327 až 331 v souladu s číslovacím systémem EU a v každém případě se lidský imunoglobulin vybral z IgG1, IgG2 a IgG4.
2. Vazebná molekula podle nároku 1, kde první lidský imunoglobulin se vybral z IgG1, IgG2 a IgG4 a druhý lidský imunoglobulin se vybral z IgG2 a IgG4.
3. Vazebná molekula podle nároku 1 nebo 2, kde 2 aminokyseliny v jedné oblasti domény C<sub>H</sub>2 se upravily na odpovídající aminokyseliny z druhé oblasti C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu.
4. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 3, kde alespoň 2 aminokyseliny v každé ze dvou diskrétních oblastí

domény C<sub>H</sub>2 se upravily na odpovídající aminokyseliny v odpovídající oblasti v druhé nebo třetí oblasti C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu.

5. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 4, kde efektorová oblast sdílí alespoň 90 % shody sekvence s první oblastí C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu.
6. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 5, která obsahuje oblast C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu vykazující jednu nebo více následujících aminokyselin nebo delecí v uvedených polohách v souladu s číslovacím systémem EU:

poloha	aminokyselina
233	P
234	V
235	A
236	(žádný zbytek) nebo G
327	G
330	S
331	S

7. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 6, která obsahuje oblast C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu zahrnující jednu nebo více následujících bloků aminokyselin nebo delecí v uvedených polohách v souladu s číslovacím systémem EU: 233P, 234V, 235A a žádný zbytek v poloze 236 nebo 233P, 234V, 235A a 236G a/nebo 327G, 330S a 331S.
8. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 5 až 7, kde efektorová doména se vybrala z G1Δab, G2Δa nebo G1Δac.
9. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 8, která dále zahrnuje úpravy, které umožňují molekule být v podstatě nulovým alotypem
10. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 9, přičemž efektorová oblast má omezenou afinitu pro FcγRI, FcγRIIa nebo FcγRIII a omezenou schopnost zprostředkovat lyzi

komplementem porovnáním s první nebo druhou oblastí  $C_H2$  těžkého řetězce lidského imunoglobulinu.

11. Vazebná molekula podle nároku 10, kde efektorová oblast si zachovala afinitu pro  $Fc\gamma RIIb$ .
12. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 11, kde se vazebná oblast odvodila z odlišného zdroje než je zdroj pro efektorovou oblast.
13. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 12, kde se vazebná molekula vybrala ze skupiny zahrnující vazebné místo protilátek, enzym, hormon, receptor, cytokin nebo antigen, ligand nebo adhezní molekulu.
14. Vazebná molekula podle libovolného z nároků 1 až 13, kde vazebná oblast je schopna vázat libovolného zástupce ze skupiny zahrnující: antigen RhD červených krvinek, aloantigen HPA krevních destiček, neutrofilový antigen, receptor T-buněk, integrin, GBM kolagen, Der P1, HPA-1a, VAP-1, laminin, lutheran, glykoprotein VI krevních destiček, glykoprotein Ia/IIa krevních destiček.
15. Vazebná molekula podle nároku 14, kde vazebná oblast se vybrala ze skupiny zahrnující vazebnou oblast z CAMPATH-1 a FOG1, OKT3, B2 (anti-HPA-1a), VAP-1, myší anti- $\alpha 3$  (IV) NC1, YTH12.5 (CD3), 2C7 (anti-Der p I), anti-lamininu, anti-lutheranu.
16. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující efektorovou oblast vazebné molekuly podle libovolného z předcházejících nároků.
17. Nukleová kyselina podle nároku 16, kde nukleotidová sekvence kóduje vazebnou molekulu podle libovolného z předcházejících nároků.
18. Nukleová kyselina podle nároku 16 nebo 17, kterou je replikovatelný vektor.
19. Nukleová kyselina podle nároku 18, kde nukleotidová sekvence je operativně spojená s promotorem.

20. Hostitelská buňka, která obsahuje nebo se transformovala vektorem podle nároku 19 nebo 20.
21. Způsob produkce vazebné molekuly podle libovolného z nároků 1 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje úpravu nukleotidové sekvence kódující první oblast C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu tak, že 2, 3 nebo 4 aminokyseliny alespoň v jedné oblasti domény C<sub>H</sub>2 odpovídají aminokyselině z druhé oblasti C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, kde oblast se vybrala ze dvou diskrétních oblastí číselovaných zbytků 233 až 236 a 327 až 331 v souladu s číslovacím systémem EU a kde v každém případě se lidský imunoglobulin vybral z IgG1, IgG2 a IgG4.
22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e 2 aminokyseliny v jedné oblasti domény C<sub>H</sub>2 se upravily tak, aby odpovídaly aminokyselinám z druhé oblasti C<sub>H</sub>2 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu.
23. Použití vazebné molekuly nebo nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 19 při navázání cílové molekuly na uvedenou vazebnou molekulu.
24. Použití podle nároku 23, kde vazebná molekula je FcγRIIb, jejíž navázání způsobuje inhibici jednoho nebo více procesů: aktivace B buněk, degranulaci žírných buněk, fagocytózu.
25. Použití podle nároku 24 při prevenci, inhibici nebo jiné interferenci s navázáním druhé vazebné molekuly na cílovou molekulu.
26. Použití podle nároku 25, kde druhá vazebná molekula je protilátka.
27. Použití podle nároku 25 nebo 26, kde cílová molekula se vybrala ze skupiny zahrnující RhD antigen červených krvinek, aloantigen HPA krevních destiček, neutrofilový antigen, receptor T-buněk, integrin, GBM kolagen, Der P1, HPA-1a, VAP-1, laminin, lutheran, glykoprotein VI krevních destiček, glykoprotein Ia/IIa krevních destiček.

28. Použití podle libovolného z nároků 24 až 27 při léčbě pacienta trpícího poruchou vybranou ze skupiny zahrnující nepříznivé ovlivnění štěpu hostitelem, nepříznivé ovlivnění hostitele štěpem, odmítnutí transplantovaného orgánu, odmítnutí transplantované kostní dřeně, autoimunitu, jako je vaskulitida, autoimunní hemolytická anemie, autoimunní trombocytopenie a artritida, aloimunitu, jako je fetální nebo neonatální aloimunní trombocytopenie, astma a alergie, chronické nebo akutní zánětlivé onemocnění, jako je Crohnova nemoc, HDN, syndrom „Goodpastures“, srpkovitá anemie, okluze koronární arterie.
29. Použití podle libovolného z nároků 23 až 28, kde vazebná molekula se aplikuje pacientovi nebo v případě, že pacient je nenarozené dítě, matce pacienta.
30. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje vazebnou molekulu podle libovolného z nároků 1 až 15 nebo nukleovou kyselinu podle libovolného z nároků 17 až 19 plus farmaceuticky přijatelný nosič.
31. Oligonukleotid vybraný ze skupiny zahrnující:
- MO22BACK: 5'TCT CCA ACA AAG GCC TCC CGT CCT CCA TCG AGA AAA 3'
- MO22: 5'TTT TCT CGA TGG AGG ACG GGA GGC CTT TGT TGG AGA 3'
- MO7BACK: 5' TCC TCA GCA CCT CCA GTC GCG GGG GGA CCG TCA GTC 3'
- MO21: 5' GAC TGA CGG TCC CGC GAC TGG AGG TGC TGA GGA 3'.

130201

PV 2000-4146  
č. s. 11630

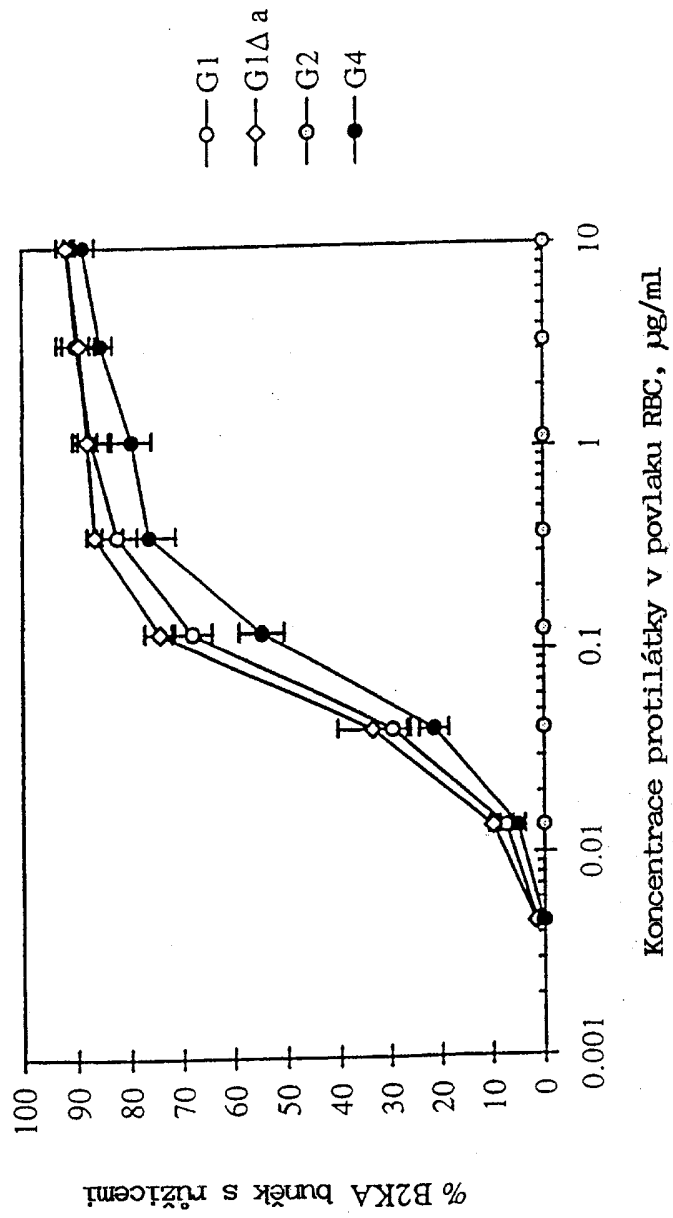
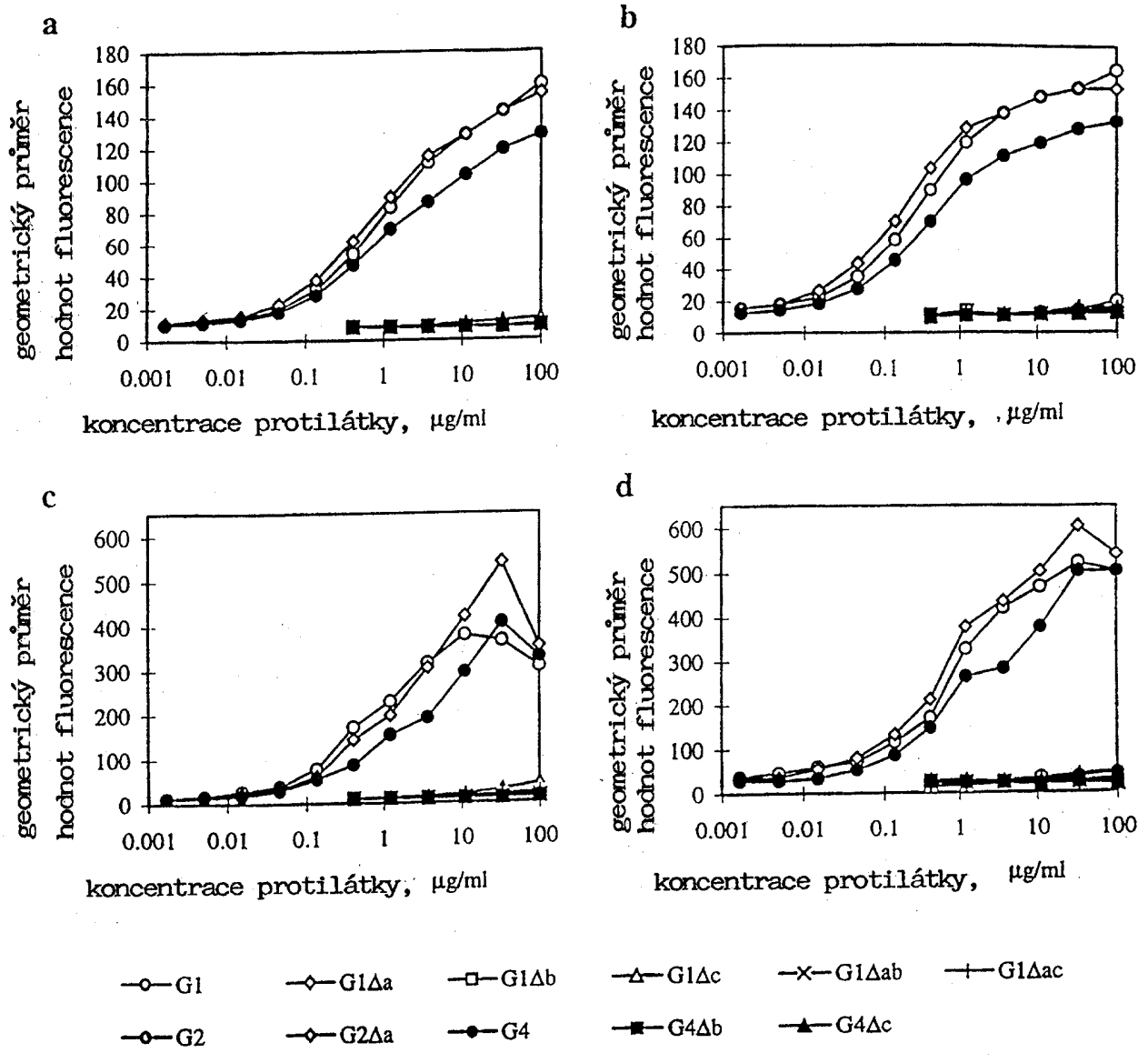


Fig. 1

Fig. 2



130201

PV 2000-4146

C.J. M630

Fig. 3

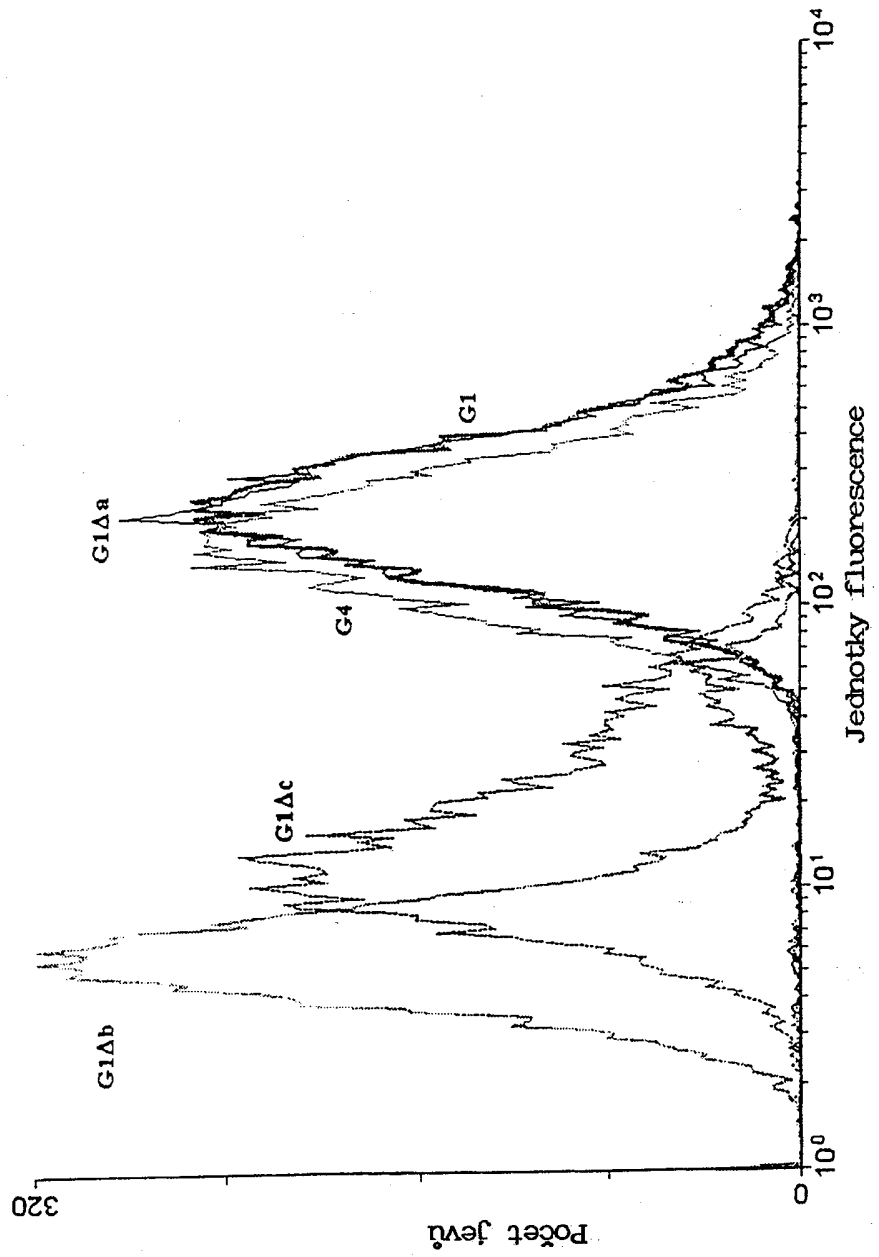


Fig. 4

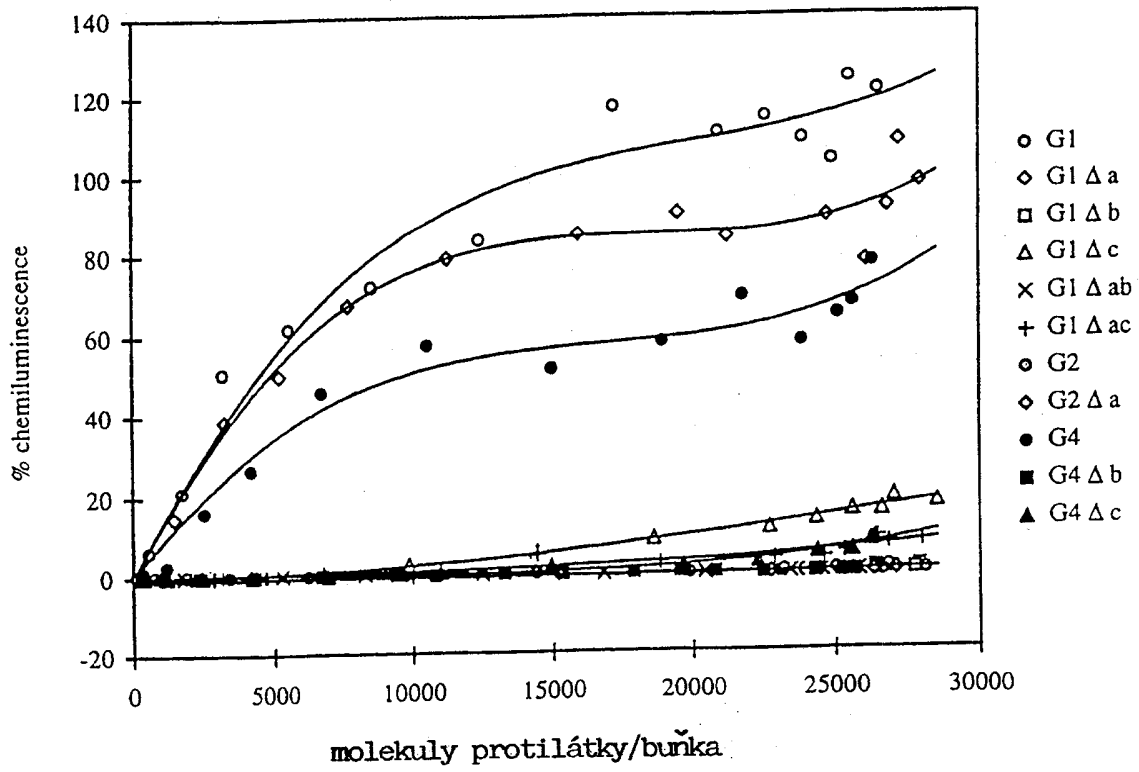


Fig. 5

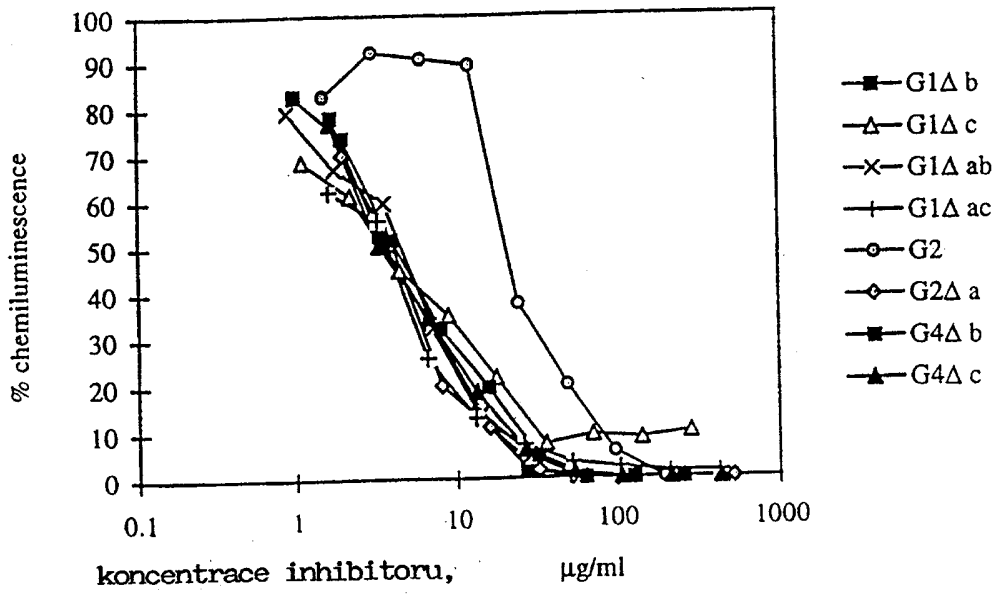


Fig. 6

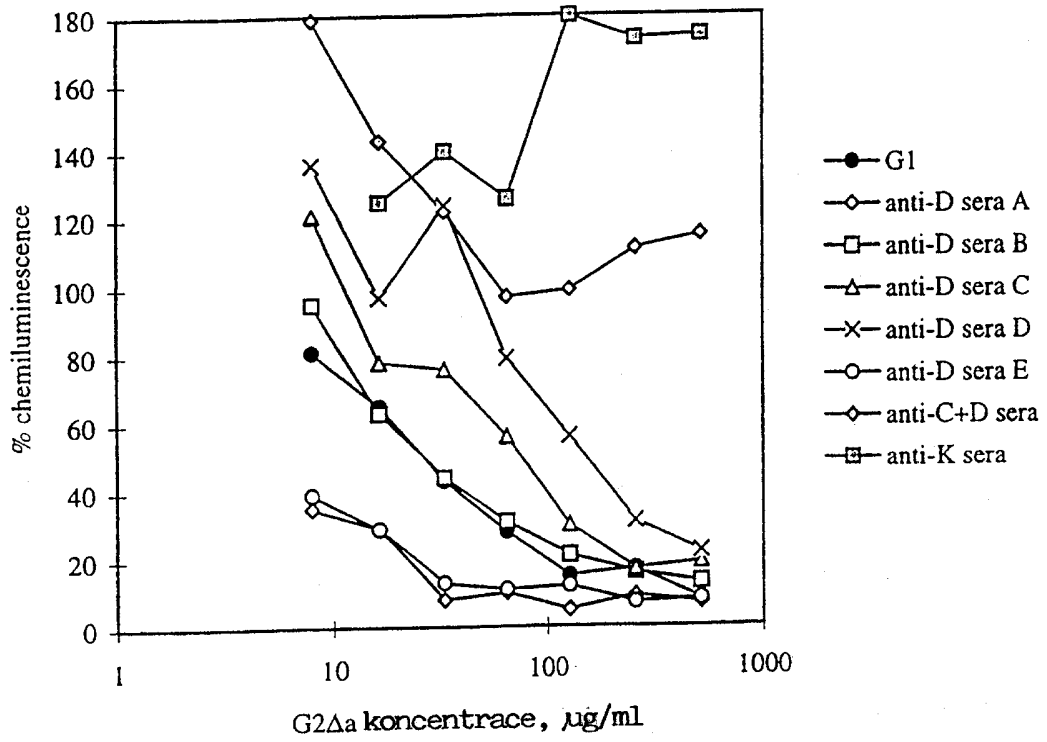


Fig. 7

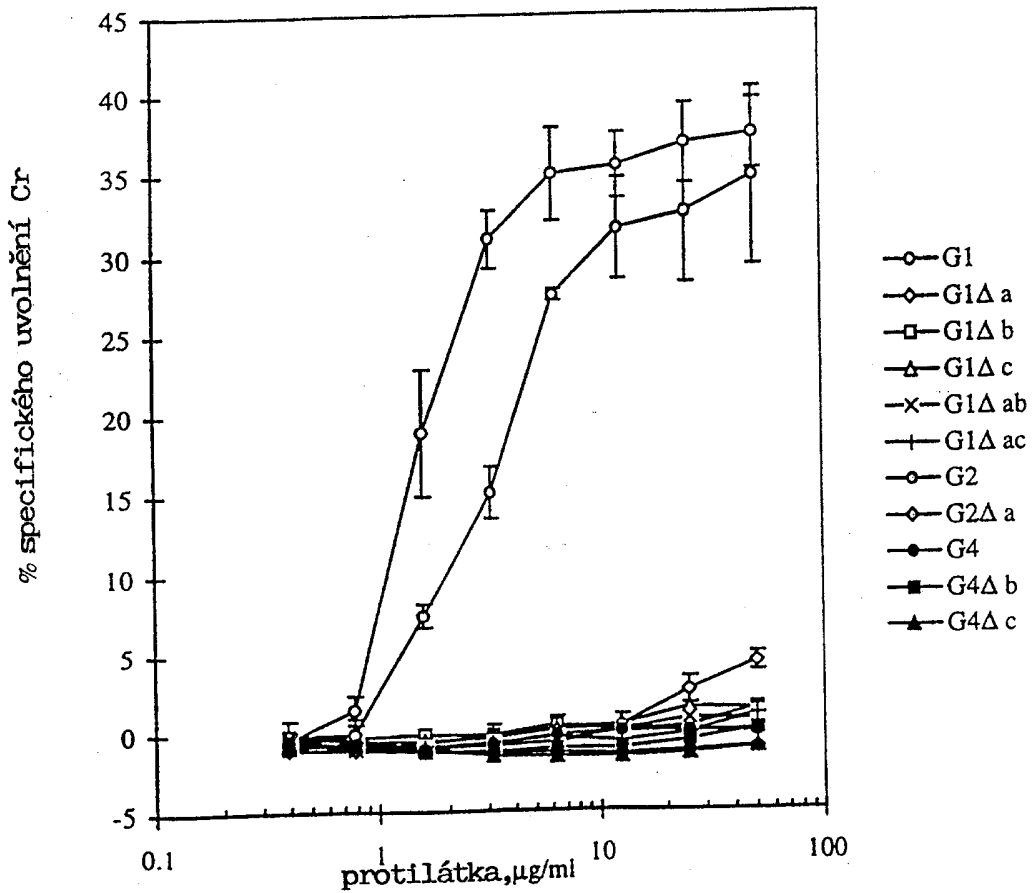


Fig. 8

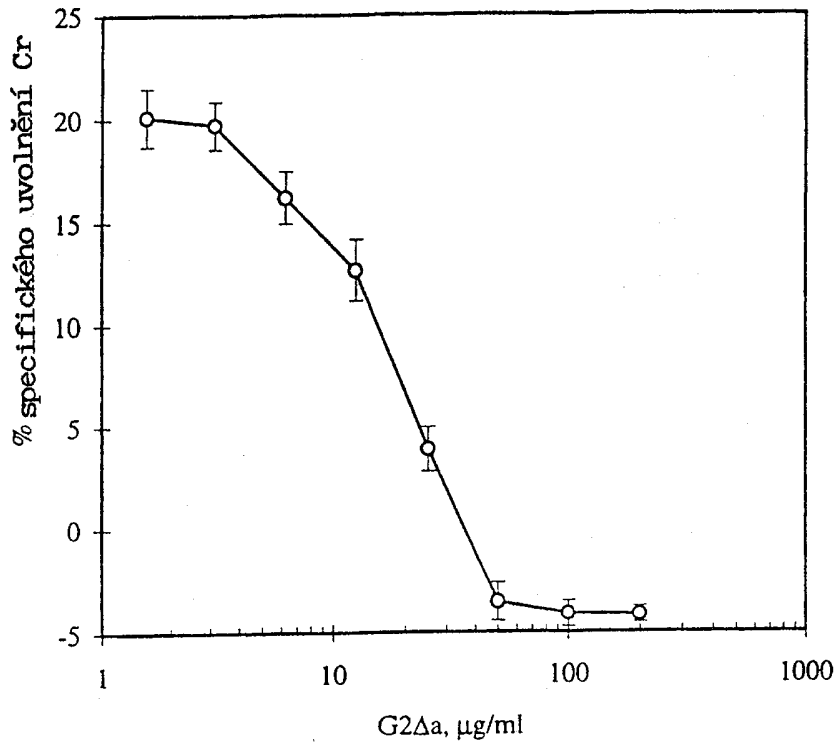


Fig. 9

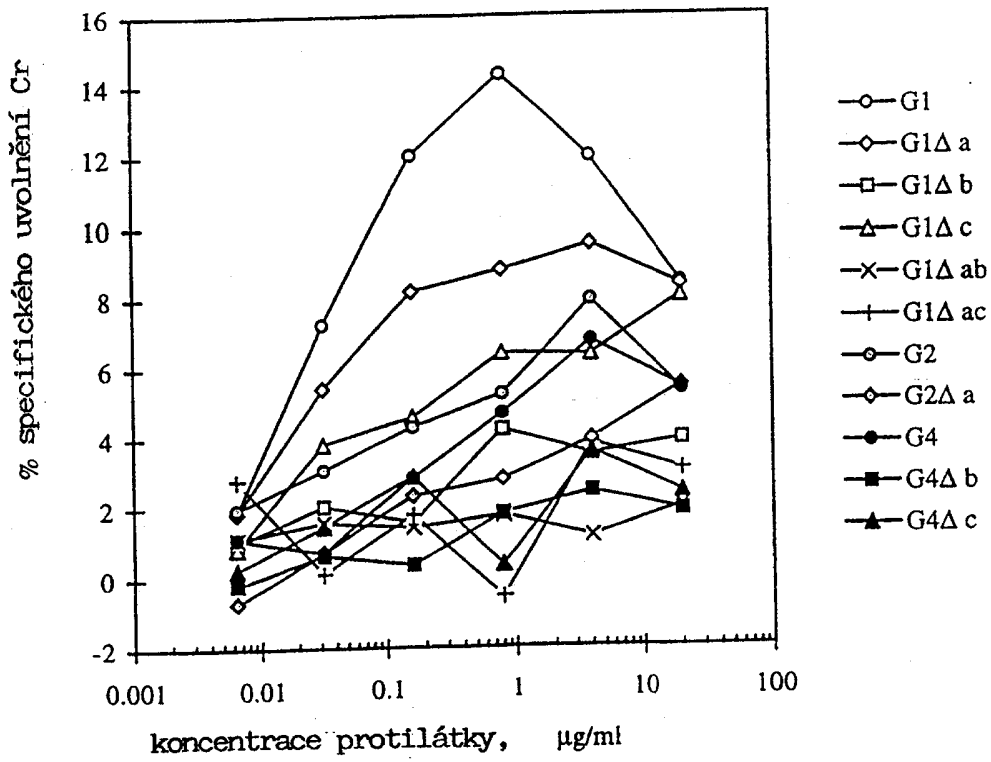


Fig. 10a

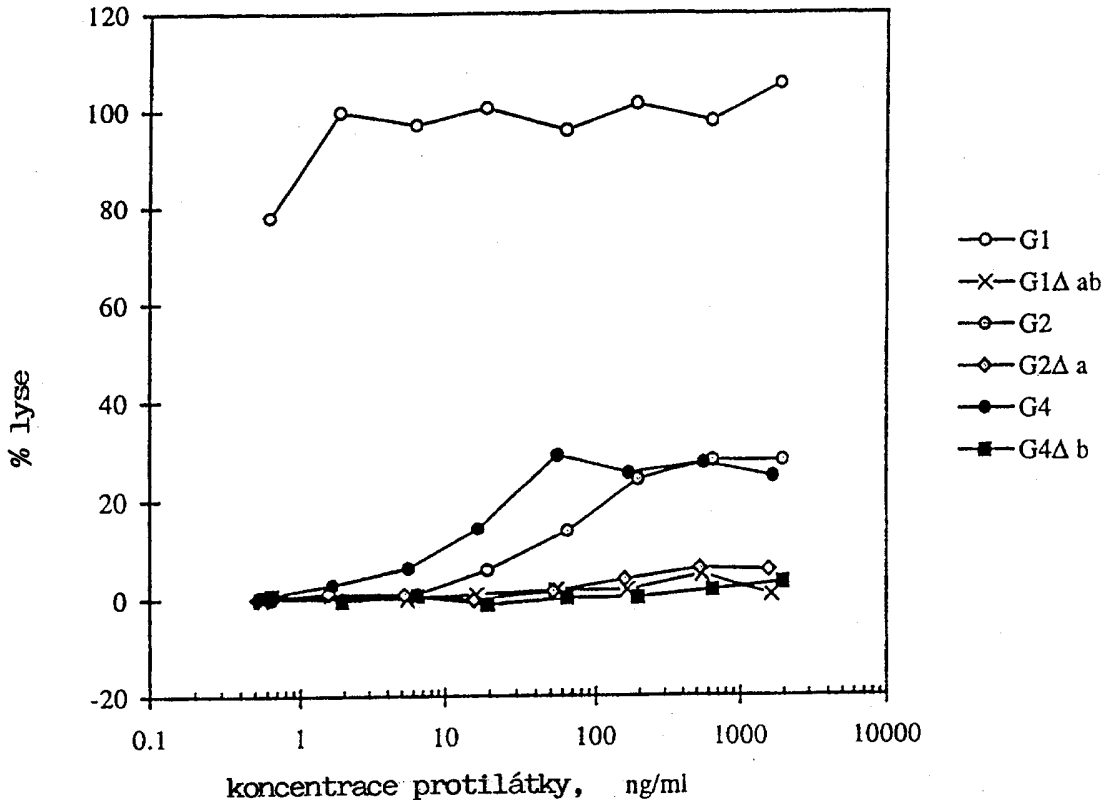


Fig. 10b

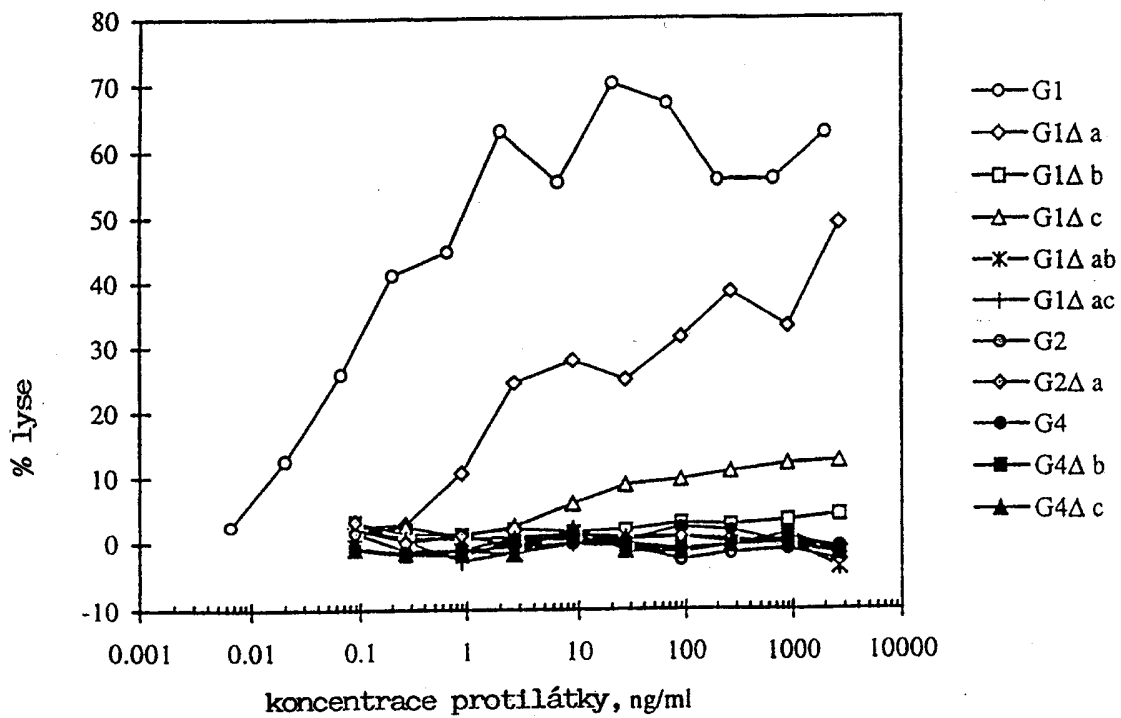


Fig. 11a

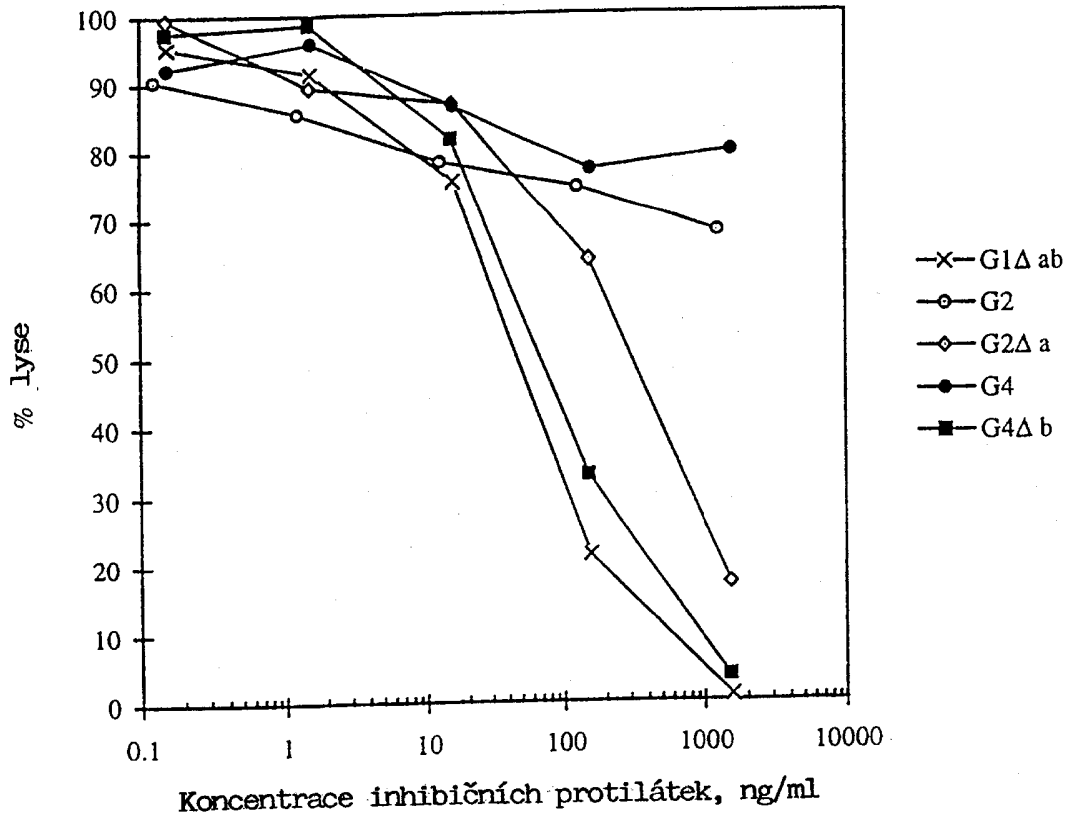


Fig. 11b

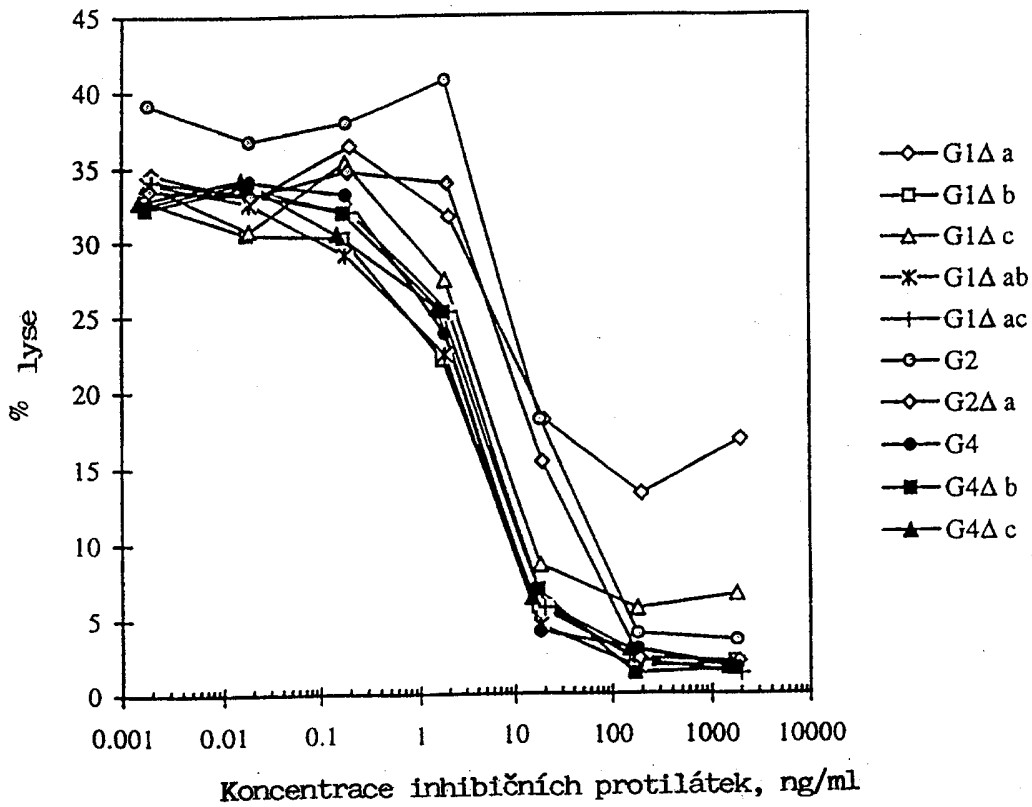


Fig. 12

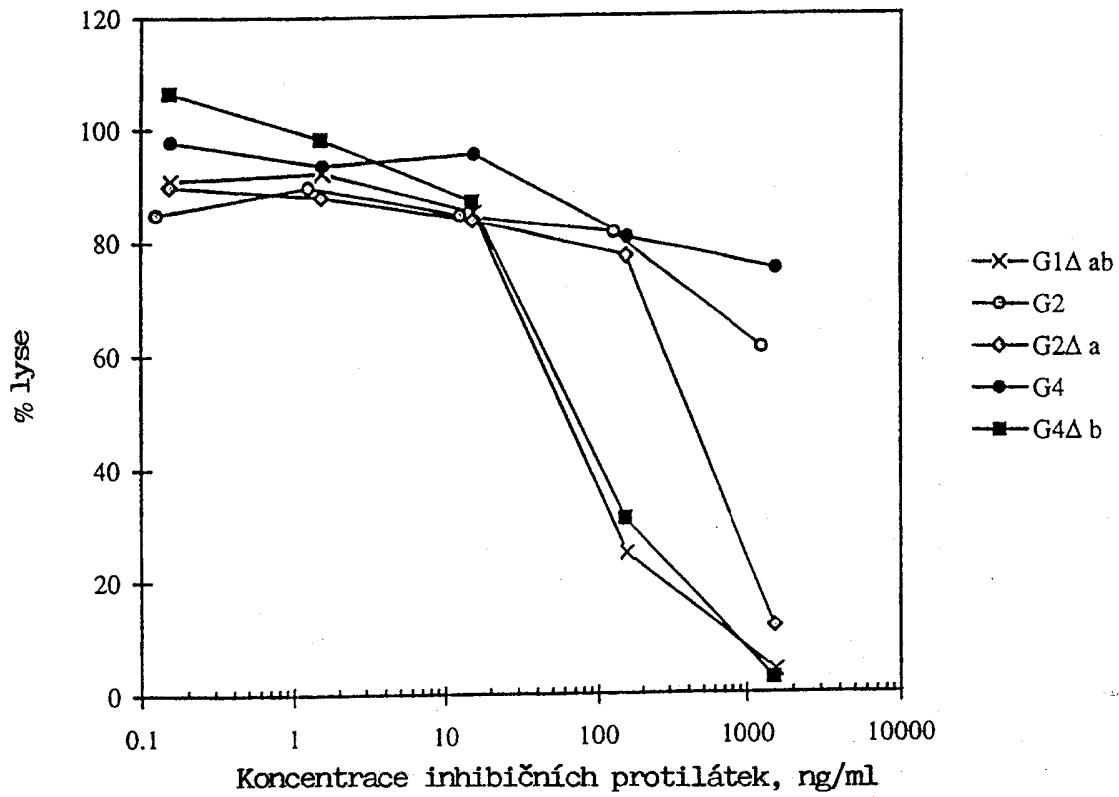
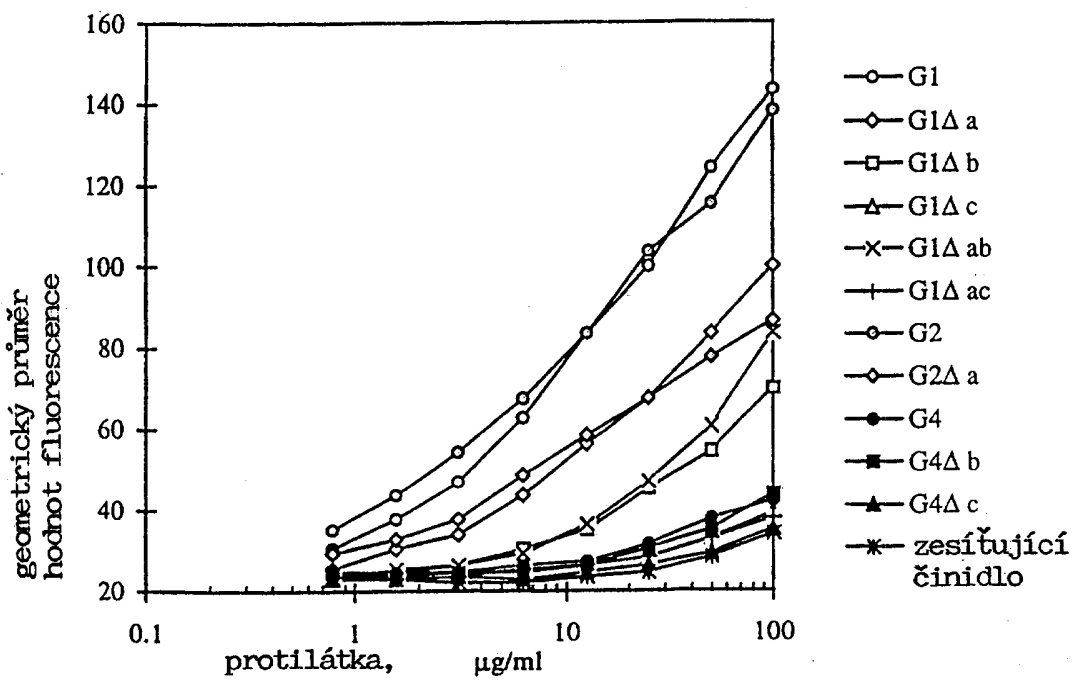


Fig. 13q



13.02.01

PV 2000-4146  
 Č.J. - 11630

Fig. 13b

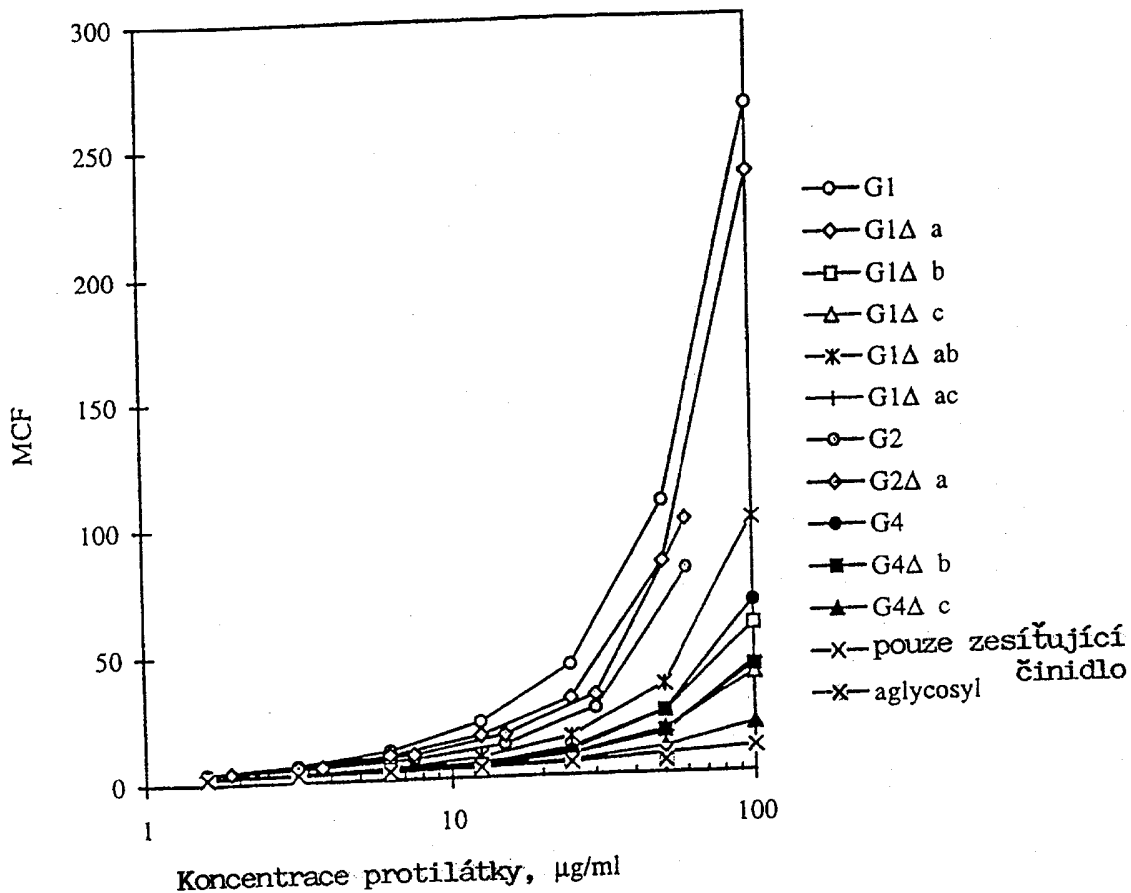
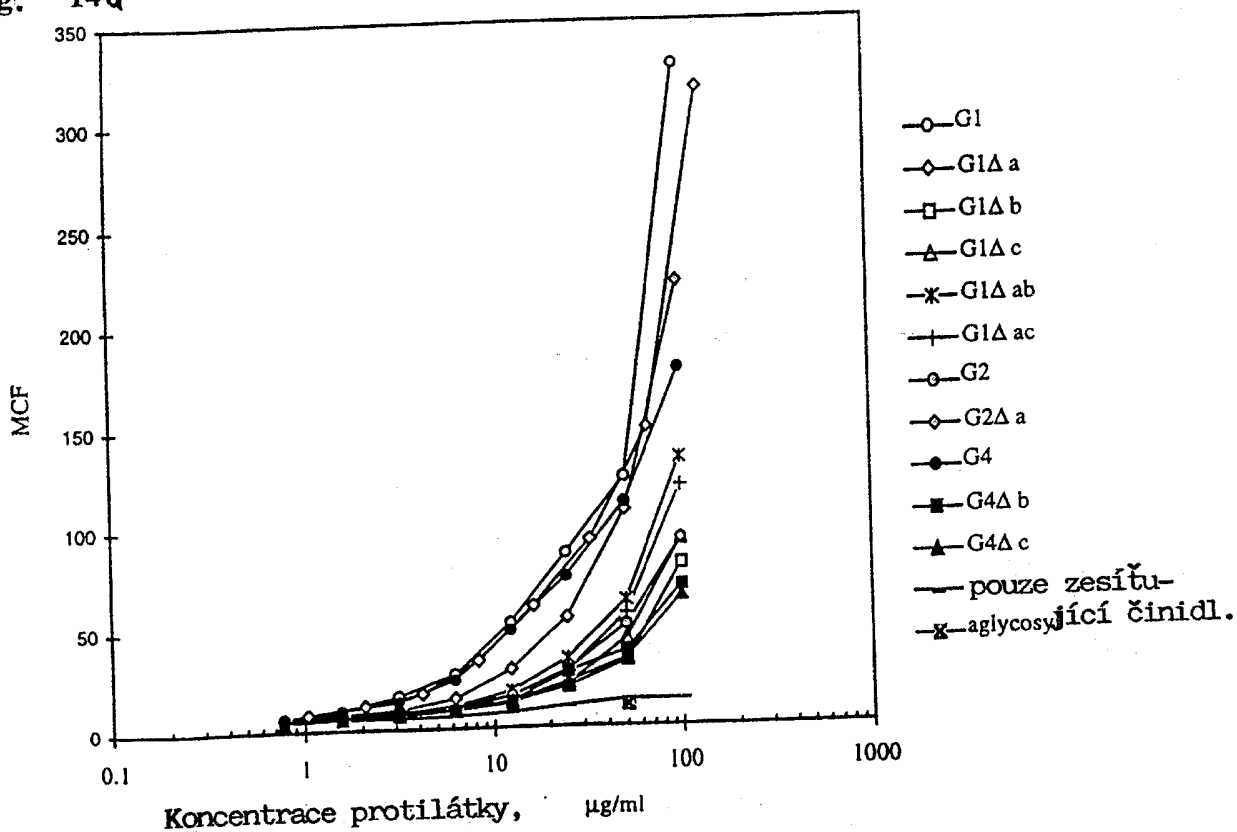


Fig. 14a



13.02.01

PV 2000-4146  
 Č.J. 11630

Fig. 14b

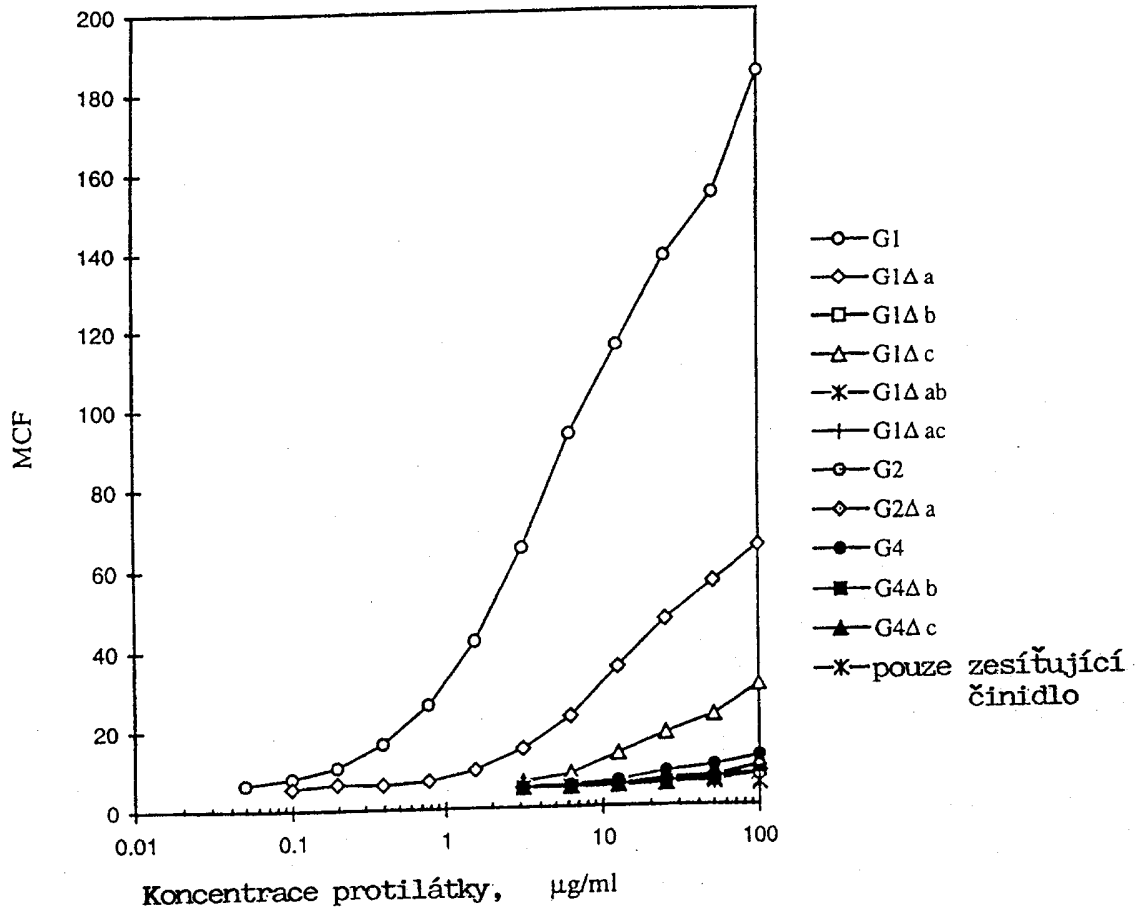


Fig. 14c

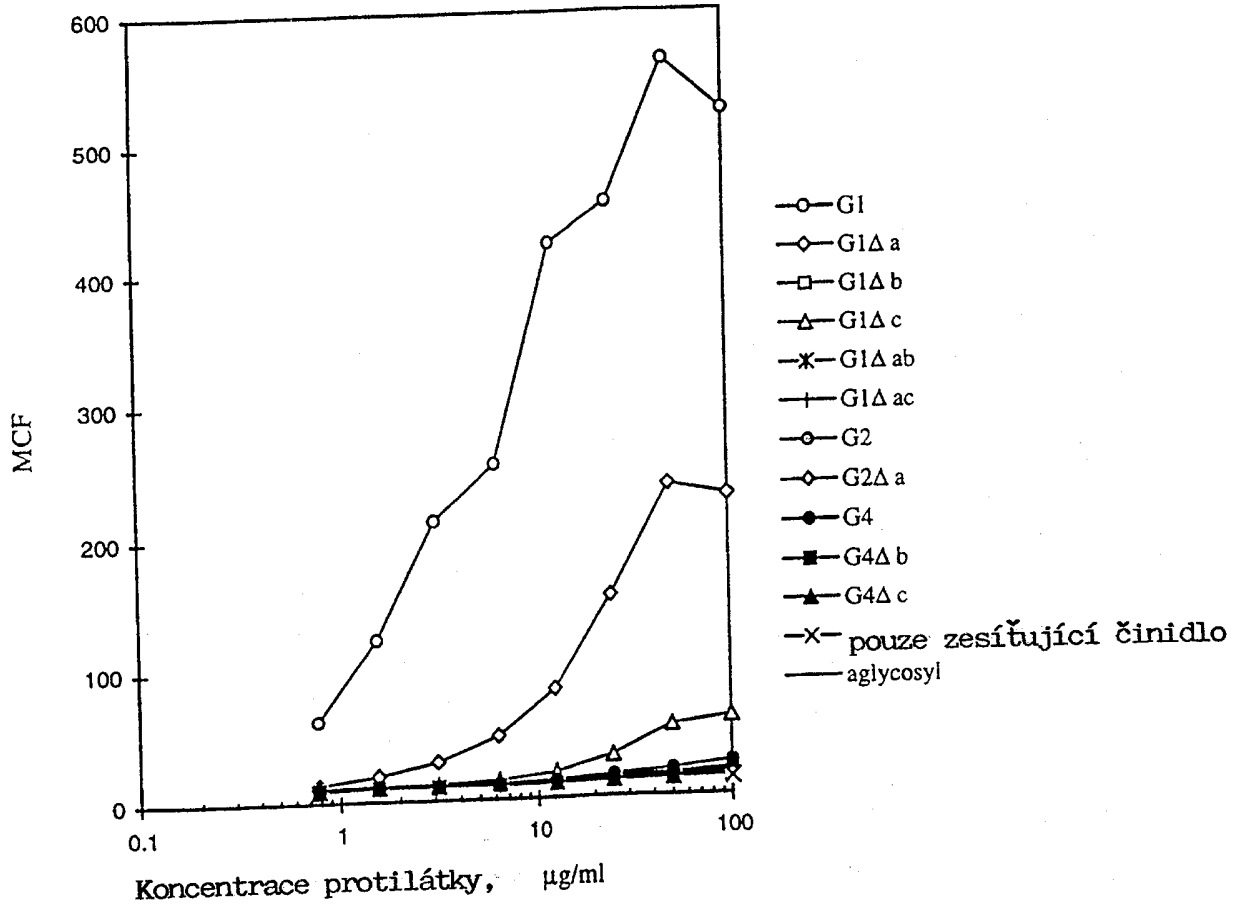


Fig. 15

Tabulka 1

Srovnání mutací v sekvencích divokého typu protilátek G1, G2 a G4

Protilátka	233	234	235	236	327	330	331
G1	E	L	L	G	A	A	P
G1Δa	E	L	L	G	G	S	S
G1Δb	P	V	A	-	A	A	P
G1Δc	P	V	A	-	G	S	S
G1Δab	P	V	A	G	G	S	S
G1Δac	P	V	A	-	G	A	P
G2	P	V	A	-	G	S	S
G2Δa	P	V	A	-	G	S	S
G4	E	F	L	-	G	S	S
G4Δb	P	V	A	-	G	S	S
G4Δc	P	V	A	G	G	S	S

Fig. 16

Zkušební systém	Série	GI	GIa	GIAb	GIAc	GIAb	GIAb	GIAb	GIAb	G2	G2Aa	G4	G4Ab	G4Ac
FcγRI: tvorba růžic	F	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-
FcγRI: fluoresc. barvení	C/F	+++	+++	-	-/+	-	-	-	-	-	-	++	-	-/+
FcγRIIa H/H fluoresc. barv.	C/F	+++	++	+	-/+	+	+	+	+++	+++	++	-/+	-/+	-
FcγRIIa R/R fluoresc. barv.	F	+++	+++	+/-	+/-	+	+	+	++	++	++	+/-	+/-	-/+
FcγRIIb1*: fluoresc. barv.	F	++++	++++	+	+	+	+	+	++	+	+++	+++	+	+
FcγRIIb NA1: tvorba růžic	F	++	+	+/-	+/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-	-	+	-	-/+
FcγRIIb NA1: fluor. barv.	F	+++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
FcγRIIb NA2: fluor. barv.	F	+++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
FcγRII: chemiluminescence	F	+++	++	-	+/-	-	-	-	-/+	-	-	+	-	-/+
Lyse komplementu	C	+++	+/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	++	++	-	-	-	-
ADCC	C	+++	++	+/-	+	-	-/+	-/+	+	+	+/-	+	-	-/+
ADCC	F	++++	+++	+	++	-	-	-	+/-	+/-	-/+	+/-	-	-

Inhibice GI při zkouš. růžic	Série	GI	GIa	GIAb	GIAc	GIAb	GIAb	GIAb	GIAb	G2	G2Aa	G4	G4Ab	G4Ac
FcγRI: tvorba růžic	F										+		+	
FcγRII: chemiluminescence	F			+++	++	++	+++	+++	+	+	+++		+++	+++
Lyse komplementu	C										+			
ADCC	F		-	++	+	++	++	++	-	-	+	-	++	++

Série CAMPATH-1 (C) nebo Fog-1 (F) protilátky

relativní účinnost při zkoušce  
 nízká účinnost, značně vyšší než základní hodnota  
 nízká účinnost, vyšší než základní hodnota  
 žádná účinnost, vyšší než základní hodnota  
 nebylo testováno

