

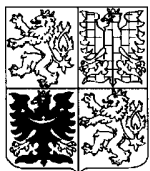
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3889

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/98107269**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/02693**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/54440**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 5/10 A 61 P 35/00
C 12 N 15/62
C 12 N 15/85
C 07 K 16/46
C 07 K 19/00
A 61 K 39/395
A 61 K 48/00
G 01 N 33/577

(71) Přihlašovatel:

MICROMET GESELLSCHAFT FÜR
BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNG MBH,
Martinsried, DE;

(72) Původce:

Dörken Bernd, Berlin, DE;
Riethmüller Gert, München, DE;
Kufer Peter, Moosburg, DE;
Lutterbüse Ralf, München, DE;
Bargou Ralf, Berlin, DE;
Löffler Anja, Finowfurt/Eichhorst, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Polypeptidy specifické pro CD19XCD3 a jejich
použití**

(57) Anotace:

Jsou popsány nové jednořetězcové multifunkční polypeptidy obsahující alespoň dvě vazebná místa specifická pro antigeny CD19 a CD3. Dále jsou poskytnuty polypeptidy, kde výše popsaný polypeptid obsahuje alespoň jednu další doménu, výhodně s předem danou funkcí. Kromě toho jsou popsány polynukleotidy kódující uvedené polypeptidy, jakož i vektory obsahující uvedené polynukleotidy a hostitelské buňky jimi transformované, a jejich použití při produkci uvedených polypeptidů. Navíc jsou poskytnuty přípravky, výhodně farmaceutické a diagnostické přípravky, zahrnující kterýkoliv z dříve popsaných polypeptidů, polynukleotidů nebo vektorů. Popsáno je také použití výše uvedených polypeptidů, polynukleotidů a vektorů pro přípravu farmaceutických přípravků pro imunoterapii, výhodně u malignit pocházejících z B lymfocytů, jako jsou například ne Hodgkinské lymfomy.

01.12.00

PV 2070-3889

81782

1

Polypeptidy specifické pro CD19CD3 a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových jednořetězcových multifunkčních polypeptidů obsahujících alespoň dvě vazebná místa specifická pro antigeny CD19 a CD3, v uvedeném pořadí. Předkládaný vynález se dále týká polypeptidu, kde výše popsaný polypeptid obsahuje alespoň jednu další doménu, výhodně s předem danou funkcí. Kromě toho, předkládaný vynález se týká polynukleotidů kódujících uvedené polypeptidy, jakož i vektorů obsahujících uvedené polynukleotidy, a dále hostitelských buněk jimi transformovaných a jejich použití ve výrobě uvedených polypeptidů. Navíc, předkládaný vynález se týká přípravků, výhodně farmaceutických a diagnostických přípravků, obsahujících kterýkoliv z výše popsaných polypeptidů, polynukleotidů nebo vektorů. Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití výše uvedených polypeptidů, polynukleotidů a vektorů pro přípravu farmaceutických přípravků pro imunoterapii, výhodně proti malignitám pocházejícím z B lymfocytů jako jsou například nehodgkinské lymfomy.

Dosavadní stav techniky

V celém textu tohoto popisu je citováno několik dokumentů. Každý z těchto zde uvedených dokumentů (včetně všech popisů výrobce, instrukcí, atd.) je tedy zahrnut do odkazů, to ale neznámá, že citovaný dokument je opravdu dřívějším stavem techniky předkládaného vynálezu.

Navzdory zdravotní závažnosti, výzkum nemoci zprostředkovaných B lymfocyty, jako jsou například

nehodgkinské lymfomy, přinesl pouze nevelký počet klinicky použitelných dat a obvyklé přístupy k léčbě podobných chorob zůstávají obtížné a nepříjemné a/nebo mají vysoké riziko relapsu. Například, ačkoli chemoterapie vysokými dávkami jako primární léčba nehodgkinských lymfomů vysokého stupně malignity může prodloužit celkové přežití, přibližně 50 % pacientů na tuto nemoc stále umírá (2-4). Kromě toho nehodgkinské lymfomy s nízkým stupněm malignity jako chronická lymfatická leukémie a lymfom buněk marginální zóny lymfatických uzlin jsou stále nevyléčitelné. To stimulovalo výzkum alternativních léčebných strategií, jako je například imunoterapie. Protilátky namířené proti molekulám buněčného povrchu definovaným CD antigeny představují jedinečnou možnost ve vývoji léčiv. Exprese určitých CD antigenů je vysoce omezena na specifickou linii lymfohemopoetických buněk a v uplynulých několika letech byly protilátky namířené proti antigenům specifickým pro lymfoidní tkáň používány pro vývoj. léčby, která byla účinná buď in vitro nebo ve zvířecích modelech (5-13). Z tohoto hlediska se ukázal být jako velmi užitečný cíl antigen CD19. CD19 je exprimován v celé linii B lymfocytů od pre-B lymfocytu do stádia zralého B lymfocytu, jeho exprese se neztrácí, je jednotně exprimován na všech lymfomových buňkách, a na kmenových buňkách se nevyskytuje (8, 14). Zajímavý postup je použití bispecifické protilátky s jednou specifitou pro CD19 a druhou pro CD3 antigeny T lymfocytů. Ale bispecifické protilátky, které jsou zatím dostupné, mají nízkou cytotoxicitu pro T lymfocyty a potřebují současně stimulující agens, aby projevíly uspokojivou biologickou aktivitu.

Základním technickým problémem předkládaného vynálezu bylo tedy poskytnout přípravky a způsoby použitelné pro léčení nemocí zprostředkovaných B lymfocyty jako jsou například různé formy nehodgkinských lymfomů. Řešení

uvedeného odborného problému je dosaženo provedením vynálezu, který je definován v patentových nárocích.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká jednořetězcového multifunkčního polypeptidu obsahujícího

(a) první doménu obsahující vazebné místo imunoglobulinového řetězce nebo protilátky specificky rozpoznávající antigen CD19, a

(b) druhou doménu obsahující vazebné místo imunoglobulinového řetězce nebo protilátky specificky rozpoznávající antigen CD3.

Termíny "první doména" a "druhá doména" podle předkládaného vynálezu znamenají, že jedno vazebné místo je namířeno proti obecnému markeru B lymfocytů CD19, který je jednotně exprimován na převážné většině maligních B lymfocytů, a druhé vazebné místo je namířeno proti CD3 antigenu lidských T lymfocytů.

Termín "vazebné místo", jak je používáný podle předkládaného vynálezu, je označením pro doménu obsahující trojrozměrnou strukturu schopnou specifické vazby k epitopu, jako nativní protilátky, volné scFv fragmenty nebo jeden z jejich odpovídajících imunoglobulinových řetězců, výhodně řetězec V_H. Tedy, uvedená doména může zahrnovat V_H a/nebo V_L doménu protilátky nebo imunoglobulinového řetězce, výhodně alespoň doménu V_H. Na druhé straně, uvedená vazebná místa obsažená v polypeptidu podle vynálezu mohou zahrnovat alespoň jednu oblast určující komplementaritu (CDR) protilátky nebo imunoglobulinového řetězce rozpoznávající antigeny CD19 a CD3. Domény vazebných míst přítomné v polypeptidu podle vynálezu mohou být odvozeny nejen z protilátek, ale také z jiných proteinů vázajících CD19 nebo CD3, jako jsou

přirozeně se vyskytující povrchové receptory nebo ligandy. Podle vynálezu je uvedené vazebné místo obsažené v doméně.

Termín "multifunkční polypeptid", jak je používán v tomto textu, je označením pro polypeptid obsahující alespoň dvě aminokyselinové sekvence pocházející z různých zdrojů, tj. ze dvou různých molekul, volitelně pocházejících z různých živočišných druhů, kde alespoň dva z uvedených zdrojů určují vazebná místa. Uvedená vazebná místa tedy určují funkce nebo alespoň některé funkce uvedeného multifunkčního peptidu. Takové polypeptidy zahrnují například bispecifické jednořetězcové (bsc) protilátky.

Termín "jednořetězcový", jak je používán podle předkládaného vynálezu, znamená, že uvedená první a druhá doména polypeptidu jsou kovalentně spojeny, výhodně ve formě souvislé lineární aminokyselinové sekvence kódované molekulou nukleové kyseliny.

CD19 označuje antigen, který je exprimován v řadě B, jako například v pre-B lymfocytech a zralých B lymfocytech, neztrácí expresi, je jednotně exprimován na všech lymfomových buňkách a chybí na kmenových buňkách (8, 14).

CD3 označuje antigen, který je exprimován na T lymfocytech jako část multimolekulárního komplexu receptoru T lymfocytu a který se skládá ze tří různých řetězců CD3 ϵ , CD3 δ a CD3 γ . Shlukování CD3 na T lymfocytech, např. prostřednictvím imobilizovaných anti-CD3-protilátek, vede k aktivaci T lymfocytu podobné zapojení receptoru T lymfocytu, ale nezávislé na specifitě typické pro jeho klon. Ve skutečnosti většina anti-CD3-protilátek rozpoznává řetězec CD3 ϵ .

Protilátky, které specificky rozpoznávají CD19 nebo CD3 antigen, jsou popsány ve stavu techniky, např. ve (24), (25) a (43), v daném pořadí, a mohou být tvořeny obvyklými způsoby v oboru známými.

Již bylo ukázáno, že bispecifické CD19XCD3 protilátky, které nemají jednořetězcovou strukturu, vykonávají T-buněčnou cytotoxicitu na lymfomových buňkách způsobem nezávislým na MHC, jsou účinné *in vitro* (5, 6, 9-11, 13, 43), na zvířecích modelech (7, 28), jakož i v některých pilotních klinických zkouškách (12, 29, 30). Doposud tyto protilátky byly tvořeny pomocí metod hybrid-hybridom, kovalentní vazbou monoklonálních protilátek (31) nebo technikou vzniku tzv. "diabody" (43). Rozsáhlejší klinické studie byly limitované skutečností, že tyto protilátky mají nízkou biologickou aktivitu, takže muselo být použito vysoké dávkování, a že používání těchto protilátek samotných neposkytovalo užitečný léčebný účinek. Kromě toho byla omezena dostupnost materiálu klinické úrovně.

Bez vazby na konkrétní teorii, má se za to, že při použití struktury bispecifické protilátky, jak je definována výše, takto vytvářené polypeptidy, jako například bispecifické protilátky CD19XCD3, jsou obvykle schopné ničit CD19-pozitivní cílové buňky prostřednictvím doplňování cytotoxických T lymfocytů bez potřeby předběžné stimulace a/nebo současné stimulace T lymfocytů. To je v ostrém protikladu ke všem známým bispecifickým CD19XCD3 protilátkám vyráběných podle jiných molekulových struktur a obvykle nezávisí na specifitě konkrétních CD19 nebo CD3 protilátek použitých pro konstrukci, např. bispecifické jednořetězcové protilátky. Nezávislost na předběžné stimulaci a/nebo současné stimulaci T lymfocytů může značně přispět k výjimečně vysoké cytotoxicitě zprostředkované polypeptidem podle vynálezu, jak je doloženo příkladem konkrétní CD19XCD3 bispecifické protilátky popsané v příkladech.

Další výhodná vlastnost polypeptidu podle vynálezu je ta, že jeho malou, poměrně kompaktní strukturu je snadné produkovat a purifikovat, tím se obejdou problémy nízké

výtěžnosti, výskyt nejasně vymezených vedlejších produktů, nebo těžkopádné purifikační postupy (15-19) publikované pro CD19XCD3 specifické protilátky doposud vyrobené z hybrid-hybridomů, pomocí chemické vazby nebo prostřednictvím renaturace z bakteriálních inkluzních tělísek. V následujícím textu budou výhodné a neočekávané vlastnosti polypeptidu podle vynálezu diskutovány bez omezení, doprovázené přípojenými příklady včetně některých výhodných provedení vynálezu, na která se odkazuje níže, která objasní obsáhlé pojetí předkládaného vynálezu.

Podle předkládaného vynálezu byl použit eukaryotický expresní systém, který byl vyvinutý pro produkci rekombinantních bispecifických jednořetězcových protilátek (1), aby vytvářel rekombinantní bispecifickou CD19XCD3 jednořetězcovou protilátku prostřednictvím exprese v buňkách CHO. Plně funkční protilátka byla snadno purifikována ze supernatantu tkáňové kultury pomocí své histidinové značky na C-konci na chromatografické koloně Ni-NTA. Specifická vazba na CD19 a CD3 byla dokázána prostřednictvím FACS analýzy. Výsledná molekula bscCD19xCD3 (bispecifická jednořetězcová CD19XCD3) podle vynálezu prokázala některé neočekávané vlastnosti:

- navodila vysokou cytotoxicitu proti lymfomům namířenou na T lymfocyty *in vitro* a *in vivo*. Dokonce i při velmi nízkých koncentracích 10-100 pg/ml a nízkém poměru E (efektor) : T (cíl) 5:1 a 2,5:1 byla pozorována významná specifická lýze lymfomových buněčných linií. Kromě toho, 3 µg až 10 µg molekuly bscCD19xCD3 podle vynálezu při soucitném podání ukázalo zřetelné a významné zlepšení zdravotního stavu. Ve srovnání s až doposud publikovanými CD19XCD3 protilátkami vyrobenými prostřednictvím metody hybridu-hybridomu nebo pomocí přístupu s "diabody" (které také představují různou strukturu), které vykazovaly cytotoxickou

aktivitu v rozmezí několika ng/ml nebo dokonce $\mu\text{g/ml}$, bscCD19xCD3 protilátka podle vynálezu se jeví mnohem účinnější (5-7, 27, 43) jak doloženo např. v připojených příkladech 4, 5 a 7.

- dokonce i nízké koncentrace bscCD19xCD3 podle vynálezu byly schopny navodit rychlou cytotoxicitu namířenou proti lymfomu (po 4 hodinách) při nízkém poměru E:T bez potřeby jakékoliv předběžné stimulace T lymfocytů. Na rozdíl od toho obvyklá CD19XCD3 bispecifická protilátka (5-7, 27) nevykázala v těchto podmínkách (totiž žádná předběžná stimulace T lymfocytů, nízký poměr E:T) významnou cytotoxickou aktivitu dokonce i při vysokých koncentracích až 3000 ng/ml. Ačkoli indukce cytotoxické aktivity bez předběžné stimulace byla také publikovaná v případě jiné konvenční CD19XCD3 protilátky, byl tento účinek dosažen pouze při vysokých koncentracích a vysokém poměru E:T (100 ng/ml, 27:1) (9) ve srovnání s bscCD19xCD3 podle vynálezu (100 pg/ml, 2,5:1). Kromě toho byl cytotoxický účinek této konvenční protilátek pozorovaný pouze po 1 dni předběžné stimulace s bispecifickou protilátkou samotnou, kdežto bscCD19xCD3 podle vynálezu indukovala cytotoxicitu namířenou proti lymfomu již po 4 hodinách. Co se týče znalostí původců vynálezu, taková rychlá a specifická cytotoxická aktivita nestimulovaných T lymfocytů při takových nízkých koncentracích a poměru E:T nebyl popsána u jiných bispecifických protilátkách doposud používaných. Ačkoli nedávno bylo ukázáno, že anti-p185HER2/anti-CD3 bispecifická F(ab)2 protilátka indukovala cytotoxickou aktivitu v podobných koncentracích jako bscCD19xCD3 podle vynálezu, tato protilátka vyžadovala 24 hodinovou předběžnou stimulaci s IL-2 (32). Tudíž, bscCD19xCD3 protilátka podle vynálezu projevila jedinečné cytotoxické vlastnosti, které tuto

molekulu odlišují od jiných bispecifických protilátek, které byly popsány.

BscCD19xCD3 podle vynálezu zprostředkovává cytotoxické účinky, které jsou specifické pro antigen, což je dokázáno fakty

- že tato protilátka selhala při lýze plasmacytomových buněčných linií NCl a L363, což jsou buněčné linie B řady neexprimující CD19 antigen, a

- že cytotoxicita proti lymfomovým buňkám může být blokována základní anti-CD19 protilátkou HD37. (HD37 protilátka je odvozená z HD37 hybridomu (22)).

Blokování metabolické dráhy perforinu prostřednictvím deprivace vápníku s EGTA zcela zastavilo bscCD19xCD3 zprostředkovanou cytotoxicitu, což svědčí pro to, že specifický lýze je spíše účinek zprostředkovaný T lymfocyty než přímý účinek protilátky samotné.

Souhrnem, bscCD19xCD3 protilátka konstruovaná podle nauky vynálezu vyniká nad až dosud popsané CD19XCD3 bispecifické protilátky vzhledem ke značně vyšší biologické aktivitě, jakož i možnosti rychlé a snadné produkce, čímž je poskytnuto dostačující množství klinického materiálu vysoké jakosti.

Proto se očekává, že bscCD19xCD3 molekuly podle vynálezu jsou vhodným kandidátem pro průkaz terapeutického prospěchu bispecifických protilátek v léčení nemocí zprostředkovaných B lymfocyty, jako například nehodgkinské lymfomy, v klinických zkouškách.

Ve výhodném provedení polypeptidu podle vynálezu jsou uvedené domény spojeny polypeptidovou spojkou. Uvedená spojka je umístěna mezi uvedenou první a uvedenou druhou doménou, kde uvedená polypeptidová spojka výhodně zahrnuje několikrát, hydrofilní, peptidem vázané aminokyseliny a spojuje

N-koncovou část uvedené první domény a C-koncovou část uvedené druhé domény.

V dalším výhodném provedení vynálezu uvedená první a/nebo druhá doména výše popsaného polypeptidu napodobuje nebo odpovídá oblastem V_H a V_L přirozené protilátky. Protilátka poskytující vazebné místo pro polypeptid podle vynálezu může být např. monoklonální protilátka, polyklonální protilátka, chimérická protilátka, humanizovaná protilátka, bispecifická protilátka, syntetická protilátka, fragment protilátky, jako například Fab, Fv nebo scFv fragmenty atd., nebo chemický modifikovaný derivát kterékoli z nich. Monoklonální protilátky mohou být připraveny například metodami, jak byly původně popsány v Köhler a Milstein (Nature, 256, 495, 1975) a Galfré (Meth. Enzymol., 73, 3, 1981), které zahrnují fúze myších myelomových buněk s buňkami sleziny pocházejících z imunizovaných savců s modifikacemi v oboru vyvinutými. Kromě toho, protilátky nebo jejich fragmenty proti dříve uvedeným antigenům mohou být získány použitím metod, které jsou popsány např. v Harlow a Lane ("Antibodies, Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Protilátky mohou pocházet z několika druhů, včetně člověka. Když jsou deriváty uvedených protilátek získány metodou vystavování na fágu (fágový displej), může být ke zvýšení účinnosti fágových protilátek, které se vážou k epitopu CD19 nebo antigenu CD3 použita povrchová plasmonová rezonance, jak využívána systémem BIAcore (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7, 97-105, 1996, Malmberg, J. Immunol. Methods 183, 7-13, 1995). Produkce chimérických protilátek je popsána například v mezinárodní patentové přihlášce WO 89/09622. Způsoby produkce humanizovaných protilátek jsou popsány v např. v přihláškách EP-A1 0 239 400 a WO 90/07861. Další zdroj protilátek používaných podle předkládaného vynálezu jsou takzvané xenogenní protilátky. Obecný princip

pro produkci xenogenních protilátek, jako například lidských protilátek v myších, je popsán např. v přihláškách WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 a WO 96/33735.

Protilátky použité podle vynálezu nebo jejich odpovídající imunoglobulinový řetězec(řetězce) mohou být dále modifikovány s použitím obvyklých metod v oboru známých, například s použitím delece aminokyseliny(aminokyselin), inserce(í), substituce(í), adice(í), a/nebo rekombinace(í) a/nebo každé jiné modifikace(í) v oboru známé buď samotné nebo v kombinaci. Metody pro zavedení takové modifikace do sekvence DNA určující aminokyselinovou sekvenci imunoglobulinového řetězce jsou odborníkovi známy (viz např. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y., 1989). Uvedené modifikace jsou výhodně prováděny na úrovni nukleové kyseliny.

V dalším výhodném provedení vynálezu je alespoň jedna z uvedených domén ve výše popsaném polypeptidu jednořetězcový fragment variabilní oblasti protilátky.

Jak je dobře známo, Fv, nejmenší protilátkový fragment, který obsahuje kompletní místo pro rozpoznávání a vazbu antigenu, se skládá z dimeru variabilních domén jednoho těžkého a jednoho lehkého řetězce (V_H a V_L) nekovalentně spojených. V této konfiguraci, která odpovídá konfiguraci nalezené u nativních protilátek, vzájemně interagují tři oblasti určující komplementaritu (CDRs) každé variabilní domény, čímž definují místo vázající antigen na povrchu dimeru V_H - V_L . Souhrnně, šest CDRs propůjčí protilátce vazebnou specifitu pro antigen. Rámce (FRs) ohraničující CDRs mají terciární strukturu, která je v podstatě uchována v nativních imunoglobulinech živočišných druhů tak různorodých jako člověk a myš. Tyto FRs slouží k tomu, aby udržovaly CDRs v jejich příslušné orientaci. Konstantní domény nejsou vyžadované pro vazebnou funkci, ale mohou napomáhat při

stabilizaci interakce V_H - V_L . Dokonce i jediná variabilní doména (nebo polovina Fv obsahující pouze tři CDRs specifické pro antigen) má schopnost rozpoznat a vázat antigen, ačkoli obvykle při nižší afinitě než celé vazebné místo (Painter, Biochem., 11, 1327-1337, 1972). Proto uvedená doména vazebného místa polypeptidu podle vynálezu může být dvojice domén V_H - V_L , V_H - V_H nebo V_L - V_L buď stejných nebo odlišných imunoglobulinů. Uspořádání domén V_H a V_L v polypeptidovém řetězci není pro předkládaný vynález rozhodující, uspořádání domén dané výše může být obráceno obvykle bez ztráty funkce. Avšak je důležité, že domény V_H a V_L jsou uspořádány tak, že místo vázající antigen se může správně prostorově uspořádat (folding).

Ve výhodném provedení polypeptidů podle vynálezu uvedené domény jsou uspořádány v pořadí V_L CD19- V_H CD19- V_H CD3- V_L CD3, kde " V_L " a " V_H " znamená lehký a těžký řetězec variabilní domény specifických anti-CD19 a anti-CD3 protilátek.

Jak bylo již pojednáno výše, uvedená vazebná místa jsou výhodně spojena flexibilní spojkou, výhodně polypeptidovou spojkou umístěnou mezi uvedenými doménami, přičemž uvedená polypeptidová spojka zahrnuje několikeré, hydrofilní, peptidem vázané aminokyseliny o délce postačující k překlenutí vzdálenosti mezi C-koncovou částí jedné z uvedených domén obsahující uvedené vazebné místo a N-koncovou částí druhé z uvedených domén obsahující uvedené vazebné místo, když polypeptid podle vynálezu přijme strukturu vhodnou pro vazbu při umístění ve vodném roztoku. Výhodně se uvedená polypeptidová spojka skládá z velkého množství glycinových, alaninových a/nebo serinových zbytků. Je dále výhodné, že uvedená polypeptidová spojka se skládá z velkého množství konsektivních kopií aminokyselinové sekvence. Obvykle se polypeptidová spojka skládá z 1 až 15 aminokyselin, ačkoli polypeptidová spojka o více než 15

aminokyselinách se může také osvědčit. Ve výhodném provedení vynálezu se uvedená polypeptidová spojka skládá z 1 až 5 aminokyselinových zbytků.

V obzvláště výhodném provedení předkládaného vynálezu polypeptidová spojka v polypeptidu podle vynálezu obsahuje 5 aminokyselin. Jak je ukázáno v připojených příkladech, uvedená polypeptidová spojka se výhodně skládá z aminokyselinové sekvence Gly Gly Gly Gly Ser.

V dalším mimořádně výhodném provedení uvedená první doména polypeptidu podle vynálezu obsahuje alespoň jednu CDR V_H a V_L oblasti zahrnující aminokyselinovou sekvenci kódovanou DNA sekvencí ukázanou na obrázku 8 od nukleotidu 82 do nukleotidu 414 (V_L) a nukleotidu 460 až 831 (V_H) a/nebo uvedená druhá doména obsahuje alespoň jednu CDR, výhodněji dvě, nejvýhodněji tři CDRs V_H a V_L oblasti obsahující aminokyselinovou sekvenci kódovanou DNA sekvencí zobrazenou na obrázku 8 od nukleotidu 847 až nukleotidu 1203 (V_H) a nukleotidu 1258 až 1575 (V_L), volitelně v kombinaci s rámcem oblastí, které se vyskytují zároveň s uvedenými CDRs v základních protilátkách. CDRs obsažené ve variabilních oblastech zobrazených na obrázku 8 mohou být určeny například podle autora Kabat („Sequences of Proteins of Immunological Interest“, U.S. Department of Health and Human Services, třetí vydání, 1983, čtvrté vydání, 1987, páté vydání, 1990). Odborník hned ocení, že vazebné místo nebo alespoň jedna CDR z něj vycházející mohou být použity pro konstrukci polypeptidu podle vynálezu. Výhodně uvedený polypeptid zahrnuje aminokyselinovou sekvenci kódovanou DNA sekvencí, jak je ukázána na obrázku 8, od nukleotidu 82 až 1575. Odborník hned ocení, že vazebné místo polypeptidu podle vynálezu může být konstruováno podle metod v oboru známých, např. jak byly popsány v Evropských patentech EP-A1 0 451 216 a EP-A1 0 549 581.

Domény vazebných míst polypeptidu podle vynálezu výhodně mají specifitu alespoň v podstatě identickou s vazebnou specifitou např. protilátky nebo imunoglobulinového řetězce, od kterého jsou odvozeny. Takové domény vazebného místa mohou mít vazebnou afinitu alespoň 10^5M^{-1} , výhodně ne vyšší než 10^7M^{-1} pro antigen CD3 a výhodně až 10^{10}M^{-1} nebo vyšší pro antigen CD19.

Ve výhodném provedení polypeptidu podle vynálezu

(a) uvedené vazebné místo první domény má afinitu alespoň přibližně 10^{-7}M , výhodně alespoň přibližně 10^{-3}M a nejvýhodněji alespoň přibližně 10^{-11}M , a/nebo

(b) uvedené vazebné místo druhé domény má afinitu menší než přibližně 10^{-7}M , výhodně menší než přibližně 10^{-6}M a nejvýhodněji řádově 10^{-5}M .

Ve shodě s výhodnými provedeními uvedenými výše je výhodné, jestliže vazebné místo rozpoznávající antigen CD19 má vysokou afinitu, aby byly s vysokou účinností zachyceny cílové buňky, které mají být zničeny. Na druhé straně, vazebná afinita vazebného místa rozpoznávajícího antigen CD3 by měla být řádově taková, jako je afinita přirozeného receptoru CD3 nebo receptoru obvykle nalézaného při interakci T-buněčného receptoru se svým ligandem, to jest peptidovým komplexem MHC na povrchu cílové buňky.

V jiném výhodném provedení vynálezu je polypeptid popsán výše bispecifická jednořetězcová protilátka.

Předkládaný vynález se dále týká polypeptidu obsahující alespoň jednu další doménu, uvedené domény jsou spojené prostřednictvím kovalentních nebo nekovalentních vazeb.

Vazba může být založena na genetické fúzi podle metod v oboru známých a výše popsaných nebo může být provedena prostřednictvím, např. chemického zesítnění (crosslinking), jak bylo popsáno například v patentové přihlášce WO 94/04686. Další doména přítomná v polypeptidu podle vynálezu může být

výhodně spojena flexibilní spojkou, výhodně polypeptidovou spojkou k jedné z domén vazebného místa, kde uvedená polypeptidová spojka zahrnuje několikeré, hydrofilní, peptidem vázané aminokyseliny o délce postačující k překlenutí vzdálenosti mezi C-koncovou částí jedné z uvedených domén a N-koncovou částí druhé z uvedených domén, když uvedený polypeptid přijme strukturu vhodnou pro vazbu při umístění ve vodném roztoku. Výhodně uvedená polypeptidová spojka je polypeptidová spojka, jak popsáno v provedeních výše. Polypeptid podle vynálezu může dále obsahovat štěpitelnou spojku nebo štěpné místo pro proteinázy, jako například enterokinázy, viz také připojené příklady.

Kromě toho uvedená další doména může mít předem definovanou specifitu nebo funkci. Například literatura obsahuje velké množství odkazů na způsoby cílení bioaktivních látek, jako například léků, toxinů a enzymů, na specifická místa v organismu za účelem zničit nebo lokalizovat maligní buňky nebo indukovat lokalizovaný lék nebo enzymatické působení. Bylo navrženo, jak dosáhnout tohoto účinku pomocí konjugace bioaktivní látky k monoklonálními protilátkám (viz, např., N.Y. Oxford University Press, a Ghose, J. Natl. Cancer Inst. 61, 657-676, 1978).

V této souvislosti se také rozumí, že polypeptidy podle vynálezu mohou být dále modifikovány prostřednictvím obvyklých metod v oboru známých. To umožňuje konstrukce chimérických proteinů obsahujících polypeptid podle vynálezu a další funkční aminokyselinové sekvence, např. jaderné lokalizační signály, transaktivační domény, DNA-vazebné domény, hormony vázající domény, proteinové značky (GST, GFP, peptid h-myc, FLAG, peptid HA), které mohou být odvozeny z heterologních proteinů. Jak je popsáno v připojených příkladech, polypeptid podle vynálezu výhodně obsahuje značku FLAG dlouhou přibližně 8 aminokyselin, viz obrázek 8.

Polypeptidy podle vynálezu mohou být používány léčebně u pacientů trpících chorobami B lymfocytů, jako lymfom pocházející z lymfocytů B, chronická lymfatická leukémie typu B (B-CLL) a/nebo u pacientů majících autoimunitní choroby se vztahem k B lymfocytům, jako například myasthenia gravis, Basedowova nemoc, Hashimotova thyreoiditis nebo Goodpastureův syndrom. Taková léčba může být uskutečněna například pomocí podávání polypeptidů podle vynálezu. Toto podávání může použít polypeptidy neoznačené i označené.

Například polypeptidy podle vynálezu mohou být podávány značené léčebným přípravkem. Tyto přípravky mohou být spojeny buď přímo nebo nepřímo s protilátkám nebo antigeny podle vynálezu. Jeden příklad nepřímé vazby je použití distanční skupiny (spacer). Tyto distanční skupiny mohou být střídavě buď nerozpustné nebo rozpustné (Diener, Science, 231, 148, 1986) a mohou být vybrány tak, aby umožnily uvolnění léku od antigenu v cílovém místě. Příklady terapeutických přípravků, které mohou být spojeny s polypeptidy podle vynálezu pro imunoterapii, jsou léky, radioizotopy, lektiny a toxiny. Léky, které mohou být konjugovány s polypeptidy podle vynálezu, zahrnují sloučeniny, které se klasický přiřazují k lékům, jako například mitomycin C, daunorubicin a vinblastin.

Při použití polypeptidů podle vynálezu konjugovaných s radioizotopy pro např. imunoterapii jsou určité izotopy vhodnější než jiné, v závislosti na takových faktorech jako je distribuce leukocytů, stejně jako stabilita a emise. Co se týče autoimunitní reakce, některé zářiče mohou být vhodnější než jiné. Obecně vzato v imunoterapii jsou upřednostňovány radioizotopy emitující částice α a β . Výhodné jsou α zářiče krátkého dosahu a vysoké energie, jako například ^{212}Bi . Příklady radioizotopů, které mohou být vázány na polypeptidy

podle vynálezu pro léčebné účely, jsou ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd a ^{188}Re .

Lektiny jsou proteiny obvykle izolované z rostlinného materiálu, které se vážou na specifické sacharidové skupiny. Mnoho lektinů je také schopno aglutinovat buňky a stimulovat lymfocyty. Ricin je toxický lektin, který byl používán imunoterapeuticky. To je prováděno vazbou α -peptidového řetězce ricinu, který je odpovědný za toxicitu, k polypeptidu, aby se umožnilo místně specifické toxické působení.

Toxiny jsou jedovaté látky produkované rostlinami, zvířaty nebo mikroorganismy, které jsou v přiměřené dávce často smrtelné. Difterický toxin je látka tvořena *Corynebacterium diphtheria*, která může být používána léčebně. Tento toxin se skládá z podjednotek α a β , které mohou být odděleny ve vhodných podmínkách. Toxická složka A může být navázána k polypeptidu podle vynálezu a může být použita pro místně specifické podání k interagujícím B a T lymfocytům, které byly přivedeny do její těsné blízkosti pomocí vazby k polypeptidu podle vynálezu.

Další léčebné přípravky, jako ty popsané výše, které mohou být připojovány k polypeptidu podle vynálezu, jakož i odpovídající ex vivo a in vivo léčebné protokoly, jsou známy nebo mohou být odborníkem snadno zjištěny. Kdekoliv je to vhodné, může odborník použít polynukleotid podle vynálezu níže popsaný, který kóduje kterýkoliv z výše popsaných polypeptidů nebo místo samotného proteinového materiálu mohou být použity odpovídající vektory.

Odborník tedy hned ocení, že polypeptid podle vynálezu může být použit pro konstrukci dalších polypeptidů požadované specifity a biologické funkce. Očekává se, že polypeptidy podle vynálezu budou mít důležitou léčebnou a vědeckou úlohu zvláště ve zdravotnictví, například při vývoji nových

léčebných přístupů k chorobám se vztahem k B lymfocytům, jako například určité formy karcinomu a autoimunitních nemocí, nebo jako zajímavé nástroje pro analýzu a modulaci odpovídajícího buněčného signálu transdukčních metabolických drah.

V dalším výhodném provedení vynálezu obsahuje uvedená alespoň jedna další doména molekulu vybranou ze skupiny skládající se z efektorových molekul s konformací vhodnou pro biologickou aktivitu, aminokyselinových sekvencí schopných sekvestrovat iont a aminokyselinových sekvencí schopných selektivní vazby na pevný podklad nebo k předem vybranému antigenu.

Uvedená další doména obsahuje výhodně enzym, toxin, receptor, vazebné místo, vazebné místo pro biosyntetickou protilátku, růstový faktor, buněčný diferenciací faktor, lymfokin, cytokin, hormon, vzdáleně detekovatelnou skupinu, antimetabolit, radioaktivní atom nebo antigen. Uvedený antigen může být např. nádorový antigen, virový antigen, mikrobiální antigen, alergen, autoantigen, virus, mikroorganismus, polypeptid, peptid nebo velké množství nádorových buněk.

Kromě toho uvedená sekvence schopná sekvestrovat iont je výhodně vybrána z kalmodulinu, metalothioneinu, jejich funkčního fragmentu nebo aminokyselinové sekvence bohaté na přinejmenším jednu z kyselin, a to kyseliny glutamové, kyseliny asparagové, lysinu a argininu.

Kromě toho uvedená polypeptidová sekvence schopná selektivní vazby k pevnému podkladu může být pozitivně nebo negativně nabitá aminokyselinová sekvence, aminokyselinová sekvence obsahující cystein, avidin, streptavidin, funkční fragment proteinu *Staphylococcus A*, GST, značka His, značka FLAG nebo Lex A. Jak je popsáno v připojených příkladech, polypeptid podle vynálezu vysvětlený na příkladu

jednořetězcové protilátky byl také exprimován s N-koncovou značkou FLAG a/nebo C-koncovou značkou His, které umožnily snadnou purifikaci a detekci. Značka FLAG používaná v příkladu obsahuje 8 aminokyselin (viz obrázek 8) a je tak výhodně použita podle předkládaného vynálezu. Ale jsou také vhodné značky FLAG skládající se ze zkrácených verzí FLAG používaných v připojených příkladech, jako například aminokyselinová sekvence Asp-Tyr-Lys-Asp.

Efektorové molekuly a aminokyselinové sekvence popsané výše mohou být přítomné v polotovaru nebo prekurzoru (proforma), který samotný je buď aktivní nebo neaktivní, a které mohou být odstraněny, když např. vstoupí do určitého buněčného prostředí.

V nejvýhodnějším provedení podle vynálezu je uvedený receptor současně stimulující povrchová molekula důležitá pro aktivaci T lymfocytů nebo obsahuje místo vázající epitop nebo místo vázající hormon.

V dalším nejvýhodnější provedení vynálezu, uvedená současně stimulující povrchová molekula je CD80 (B7-1) nebo CD86 (B7-2).

V ještě dalším provedení se předkládaný vynález týká polynukleotidů, které při expresi kódují výše popsané polypeptidy. Uvedené polynukleotidy mohou být fúzovány k vhodné expresní kontrolní sekvenci v oboru známé, aby zajistily vlastní transkripci a translaci polypeptidu.

Uvedený polynukleotid může být např. DNA, cDNA, RNA nebo synteticky vyrobená DNA či RNA nebo rekombinantně vyrobená chimérická molekula nukleové kyseliny zahrnující jakýkoliv z polynukleotidů buď samotný nebo v kombinaci. Uvedený polynukleotid je výhodně část vektoru. Takové vektory mohou zahrnovat další geny, jako například markerové geny, které umožní selekci uvedeného vektoru ve vhodné hostitelské buňce a ve vhodných podmínkách. Výhodně je polynukleotid podle

vynálezu operativně připojen k expresní kontrolní sekvenci umožňující expresi v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách. Expresí uvedený polynukleotid zahrnuje transkripci polynukleotidu do translatovatelné mRNA. Regulační prvky zajišťující expresi v eukaryotických buňkách, výhodně savčích buňkách, jsou dobře odborníkovi známy. Obvykle zahrnují regulační sekvence zajišťující začátek transkripce a volitelně poly-A signály zajišťující ukončení transkripce a stabilizaci transkriptu. Další regulační prvky mohou zahrnovat transkripční stejně jako translační zesilovače, a/nebo přirozeně přidružené nebo heterologní promotorové oblasti. Možné regulační prvky připouštějící expresi v prokaryotických hostitelských buňkách zahrnují např. promotor PL, lac, trp nebo tac v *E. coli*, a příklady regulačních prvků umožňujících expresi v eukaryotických hostitelských buňkách jsou promotory AOX1 nebo GAL1 ve kvasinkách nebo promotor CMV, SV40, RSV (Rous sarcoma virus), zesilovač CMV, zesilovač SV40 nebo globinový intron v buňkách savců a dalších zvířat. Kromě prvků, které jsou odpovědné za počátek transkripce, mohou tyto regulační prvky také zahrnovat transkripční terminační signály, jako například místo SV40-polyA nebo místo tk-poly-A, po směru transkripce od polynukleotidu. Kromě toho v závislosti na použitém expresním systému mohou být ke kódující sekvenci polynukleotidu podle vynálezu přidány vedoucí sekvence schopné směřování polypeptidu k buněčnému kompartmentu nebo sekrece polypeptidu do média a jsou v oboru dobře známy, viz také např. připojené příklady. Vedoucí sekvence je (jsou) sestaveny ve vhodné fázi s translačními, iniciačními a terminačními sekvencemi a výhodně vedoucí sekvencí schopnou řízené sekrece translatovaného proteinu nebo jeho části do periplazmatického prostoru nebo extracelulárního média. Heterologní sekvence mohou volitelně kódovat fúzní protein

včetně N-koncového identifikačního peptidu propůjčujícího požadované vlastnosti, např. stabilizaci nebo zjednodušenou purifikaci exprimovaného rekombinantního produktu, viz výše. V této souvislosti, vhodné expresní vektory jsou v oboru známy, jako například cDNA expresní vektor pcDV1 podle Okayamy-Berga (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-VitroGene) nebo pSPORT1 (GIBCO BRL).

Expresní kontrolní sekvence jsou výhodně eukaryotické promotorové systémy ve vektorech schopných transformovat nebo transfekovat eukaryotické hostitelské buňky, ale kontrolní sekvence pro prokaryotické hostitele mohou být také použity. Jakmile byl vektor zaveden do vhodného hostitele, je hostitel udržován v podmínkách vhodných pro vysokou expresi nukleotidové sekvence, a je-li žádoucí, může následovat sběr a purifikace polypeptidu podle vynálezu, viz např. připojené příklady.

Jak bylo popsáno výše, polynukleotid podle vynálezu může být použit samotný nebo jako část vektoru pro expresi polypeptidu podle vynálezu v buňkách pro např. genovou terapii nebo diagnostiku nemocí se vztahem k B lymfocytům. Polynukleotidy nebo vektory obsahující DNA sekvence kódující jakýkoliv z výše popsáných polypeptidů jsou zavedeny do buněk, které dále produkují požadovaný polypeptid. Genová terapie, která je založena na zavedení terapeutických genů do buněk prostřednictvím *ex vivo* nebo *in vivo* metod, je jednou z nejdůležitějších aplikací genového přenosu. Vhodné vektory, metody nebo systémy pro podávání genů pro *in vitro* nebo *in vivo* genovou terapii jsou popsány v literatuře a jsou odborníkovi známy (viz např. Giordano, *Nature Medicine*, 2, 534-539, 1996, Schaper, *Circ. Res.*, 79, 911-919, 1996, Anderson, *Science*, 256, 808-813, 1992, Verma, *Nature*, 389, 239, 1994, Isner, *Lancet*, 348, 370-374, 1996, Muhlhauser, *Circ. Res.*, 77, 1077-1086, 1995, Onodera, *Blood*, 91, 30-36,

1998, Verma, Gene Ther., 5, 692-699, 1998, Nabel, Anna. N.Y. Acad. Sci., 811, 289-292, 1997, Verzeletti, Hum. Gene Ther., 9, 2243-51, 1998, Wang, Nature Medicine, 2, 714-716, 1996, WO 94/29469, WO 97/00957, US 5,580,859, US 5,589,466, nebo Schaper, Current Opinion in Biotechnology, 7, 635-640, 1996, a odkazy v nich citované). Polynukleotidy a vektory podle vynálezu mohou být navrženy pro přímé zavedení nebo pro zavedení prostřednictvím lipozomy nebo virové vektory (např. adenovirové, retrovirové) do buňky.

Uvedená buňka je výhodně buňka zárodečné linie, embryonální buňka nebo vajíčko nebo buňka z nich pocházející, nejvýhodněji uvedená buňka je kmenová buňka. Příklad embryonální kmenové buňky může být, *inter alia*, kmenová buňka jak je popsána v práci autora Nagy (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8424-8428, 1993).

Podle výše uvedeného se předkládaný vynález týká vektorů, zejména plazmidů, kozmidů, virů a bakteriofágů obvykle používaných v genetickém inženýrství, které obsahují polynukleotid kódující polypeptid podle vynálezu. Uvedený vektor je výhodně expresní vektor a/nebo vektor pro genový přenos nebo cílicí (targeting) vektor. Expresní vektory odvozené z virů, například retrovirů, viru vakcinie, adeno-asociovaných virů, herpetických virů nebo viru bovinního papillomu, mohou být použity pro dodání polynukleotidů nebo vektoru podle vynálezu do populací cílových buněk. Metody, který jsou odborníkovi dobře známy, mohou být používány ke konstrukci rekombinantní vektorů, viz například metody popsané v práci Sambrooka a kol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y., 1989, a Ausubela a kol., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Nebo mohou být polynukleotidy a vektory podle vynálezu pro dodání k cílovým buňkám

rekonstituovány do lipozomů. Vektory obsahující polynukleotidy podle vynálezu mohou být přeneseny do hostitelské buňky prostřednictvím známých metod, které se mění v závislosti na typu buněčného hostitele. Například transfekce chloridem vápenatým je obvykle použita pro prokaryotické buňky, zatímco ošetření fosfátem vápenatým nebo elektroporace mohou být použity pro jiné buněčné hostitele, viz Sambrook, výše. Jakmile jsou exprimovány, mohou být polypeptidy podle předkládaného vynálezu purifikovány podle v oboru standardního postupu, včetně precipitace sulfátem amonným, na afinitních kolonách, sloupcovou chromatografií, gelovou elektroforézou apod. (viz Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y., 1982). Pro farmaceutické použití jsou výhodné v podstatě čisté polypeptidy s homogenitou alespoň 90 až 95 %, nejvýhodnější jsou s homogenitou 98 až 99% nebo více. Jakmile jsou jednou purifikovány, částečně nebo na požadovanou homogenitu, mohou být polypeptidy pak používány léčebně (včetně mimotělního přístupu) nebo při vývoji a provádění testů.

V ještě další provedení se předkládaný vynález týká buňky obsahující polynukleotid nebo vektor popsany výše. Když se uvažuje o léčebných použitích polypeptidu, je uvedená buňka výhodně eukaryotická, nejvýhodněji savčí buňka. Ovšem kvasinky a méně výhodné prokaryotické např. bakteriální buňky mohou také posloužit, zejména jestliže produkovaný polypeptid je používán jako diagnostický prostředek.

Polynukleotid nebo vektor podle vynálezu který je přítomný v hostitelské buňce, může být buď integrovaný do genomu hostitelské buňky nebo může být udržován extrachromozomálně.

Termín "prokaryotický" je chápán tak, že zahrnuje všechny bakterie, které mohou být transformovány nebo transfekovány molekulami DNA nebo RNA pro expresi polypeptidu

podle vynálezu. Prokaryotičtí hostitelé zahrnují Gram-negativní jakož i Gram-pozitivní bakterie jako například *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis*. Termín "eukaryotický" je chápán tak, že zahrnuje kvasinky, vyšší rostliny, hmyz a výhodně savčí buňky. V závislosti na hostiteli použitém v postupu rekombinantní produkce mohou být polypeptidy podle předkládaného vynálezu glykosylovány nebo mohou být bez glykosylace. Polypeptidy podle vynálezu mohou také zahrnovat počáteční aminokyselinový zbytek methionin. Polynukleotid kódující polypeptid podle vynálezu může být použitý pro transformaci nebo transfekci hostitele s použitím jakékoliv z metod odborníkovi obecně známých. Obzvláště výhodné je použití plazmidu nebo viru obsahujícího kódující sekvenci polypeptid podle vynálezu, ke které je navíc geneticky fúzovaná N-koncová značka FLAG a/nebo C-koncová značka His. Délka uvedené značky FLAG je výhodně přibližně 4 až 8 aminokyselin, nejvýhodněji 8 aminokyselin. Metody pro přípravu fúzovaných, operativně spojených genů a exprimujících se v např. savčích buňkách a bakteriích jsou v oboru známy (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Genetické konstrukty a metody popsané zde mohou být využity pro expresi polypeptidu podle vynálezu v eukaryotických nebo prokaryotických hostitelích. Obecně vzato, ve spojení s hostitelem jsou používány expresní vektory obsahující promotorové sekvence, které usnadní účinnou transkripci vloženého polynukleotidu. Expresní vektor typicky obsahuje počátek replikace, promotor a terminátor, jakož i specifické geny, které jsou schopné zajistit fenotypovou selekci transformovaných buněk. Kromě toho pro rozsáhlou produkci polypeptidu podle vynálezu mohou být používána transgenní zvířata, výhodně savci, obsahující buňky podle vynálezu.

V dalším provedení se předkládaný vynález tedy týká postupu pro přípravu polypeptidu popsaného výše zahrnující kultivaci buněk podle vynálezu v podmínkách vhodných pro expresi polypeptidů a izolaci polypeptidu z buňky nebo kultivačního média.

Transformovaní hostitelé mohou růst ve fermentoru a mohou být pěstováni podle metod v oboru známých tak, aby bylo dosaženo optimálního růstu buněk. Polypeptid podle vynálezu může pak být izolován z růstového média, buněčného lyzátu nebo frakcí buněčných membrán. Izolace a purifikace např. mikrobiálně exprimovaných polypeptidů podle vynálezu se může provádět jakýmikoliv obvyklými prostředky jako například separace preparativní chromatografií a imunologická separace zahrnující například použití monoklonálních nebo polyklonálních protilátek namířených např. proti značce na polypeptidu podle vynálezu nebo jak je popsáno v připojených příkladech.

Předkládaný vynález tudíž umožní rekombinantní produkci polypeptidů obsahujících vazebná místa s afinitou a specifitou pro epitopy antigenů CD19 a CD3, podle pořadí, a volitelně další funkční domény. Jak vysvitá z již uvedeného, vynález poskytne velkou rodinu polypeptidů obsahujících tato vazebná místa pro jakékoliv použití v léčebných a diagnostických postupech. Odborníkovi je zřejmé, že polypeptidy podle vynálezu mohou být dále spojeny s dalšími skupinami, jak popsáno výše, pro např. cílení léku a použití pro zobrazovací metody. Tato vazba může být provedena po expresi polypeptidů chemickým způsobem k místu připojení nebo produkt obsahující vazbu může být konstruován v polypeptidu podle vynálezu již na úrovni DNA. DNA je pak exprimována ve vhodném hostitelském systému a exprimované proteiny jsou soustředěny a renaturovány, je-li to nezbytné. Jak popsáno výše, vazebná místa jsou výhodně odvozena

z variabilní oblasti protilátek. Po této stránce, technologie hybridomu umožní produkci buněčných linií secernujících protilátky proti téměř každé požadované látce, která vyvolává imunitní reakci. Z cytoplazmy hybridomu pak může být získána RNA kódující imunoglobulinové lehké a těžké řetězce. 5' koncová část mRNA může být použita pro přípravu cDNA, která bude použita ve způsobu podle předkládaného vynálezu. DNA kódující polypeptidy podle vynálezu může být postupně exprimována v buňkách, výhodně savčích buňkách.

V závislosti na hostitelské buňce mohou být pro dosažení správné konformace požadovány renaturační metody. Je-li to nutné, mohou být v DNA vytvořeny bodové substituce vyhledané pro optimalizaci vazby, s použitím obvyklé kazetové mutagenese nebo jiné metody proteinového inženýrství, například jak je popsána na tomto místě. Příprava polypeptidů podle vynálezu může také záviset na znalosti aminokyselinové sekvence (nebo odpovídající sekvence DNA či RNA) bioaktivních proteinů, jako například enzymů, toxinů, růstových faktorů, buněčných diferenciačních faktorů, receptorů, antimetabolitů, hormonů nebo různých cytokinů nebo lymfokinů. Takové sekvence jsou publikované v literatuře a dosažitelné prostřednictvím počítačových databank. Například polypeptid podle vynálezu může být konstruovaný tak, že se např. skládá z jednořetězcového Fv fragmentu a extracelulární části lidského současně stimulujícího proteinu CD80 (B7-1) připojeného prostřednictvím spojky (Gly4Ser1)₁. CD80 současně stimulující protein patří do rodiny Ig. Je to silně glykosylovaný protein o 262 aminokyselinách. Podrobnější popis byl publikován v práci Freeman (J. Immunol., 143, 2714-2722, 1989). Stabilní exprese může být provedena v např. DHFR deficitních CHO buňkách, jak popsáno v práci Kaufmann (Methods Enzymol. 185, 537-566, 1990). Protein může pak být purifikován díky své značce His připojené na C-koncové části

s použitím kolony Ni-NTA (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 7021-7025, 1995).

Navíc předkládaný vynález poskytuje sloučeniny obsahující výše uvedený polypeptid, polynukleotid nebo vektor podle vynálezu.

Předkládaný vynález se výhodně týká přípravků, které jsou farmaceutické přípravky zahrnující výše uvedený polypeptid(y), polynukleotid(y) nebo vektor(y) podle vynálezu.

Farmaceutický přípravek podle předkládaného vynálezu může dále zahrnovat farmaceuticky přijatelný nosič. Příklady vhodných farmaceutických nosičů jsou v oboru dobře známy a zahrnují fyziologické roztoky pufrované fosfáty, vodu, emulze, jako například emulze olej/voda, různé druhy smáčedel, sterilní roztoky, atd. Přípravky zahrnující tyto nosiče mohou být formulovány pomocí dobře známých obvyklých metod. Tyto farmaceutické přípravky mohou být podávány pacientovi ve vhodné dávce. Podávání vhodných přípravků se může provádět různými způsoby např. prostřednictvím intravenózního, intraperitoneálního, subkutánního, intramuskulárního, lokálního nebo intradermálního podávání. Dávkovací režim bude určen ošetřující lékařem a klinickými faktory. Jak je v lékařských oborech dobře známo, dávkování pro každého pacienta závisí na mnoha faktorech, včetně velikosti pacienta, tělesného povrchu, věku, konkrétní sloučenině, která má být podávána, pohlaví, času a způsobu podávání, obecném zdravotním stavu a dalších lécích, které jsou podávány současně. Obecně dávkování při pravidelném podávání farmaceutického přípravku by mělo být v rozmezí 1 µg až 10 mg jednotek za den. Jestliže léčebný režim je ve formě souvislé infúze, mělo by být dávkování také v rozmezí 1 µg až 10 mg jednotek na kilogram tělesné hmotnosti za minutu. Ale výhodnější dávkování pro kontinuální infúzi by mohlo být

v rozmezí 0,01 μg až 10 mg jednotek na kilogram tělesné hmotnosti za hodinu. Obzvláště výhodná dávkování jsou uvedena níže. Pokrok může být monitorován periodickým vyšetřováním. Dávka bude kolísat, ale výhodné dávkování pro intravenózní podávání DNA je přibližně 10^6 až 10^{12} kopií molekuly DNA. Přípravky podle vynálezu mohou být podávány lokálně nebo systémově. Podávání je většinou parenterální např. intravenózní, DNA může být také podávána namířena na cílové místo např. biolistickou metodou na vnitřní nebo vnější místo určení nebo prostřednictvím katétru na místo v tepně. Přípravky pro parenterální podávání zahrnují sterilní vodné nebo roztoky jiné než vodné, suspenze a emulze. Příklady rozpouštědel jiných než vodných jsou propylenglykol, polyetylglykol, rostlinné oleje jako olivový olej a organické estery vhodné pro injekci jako například etyloleát. Vodné nosiče zahrnují vodu, alkoholové/vodné roztoky, emulze nebo suspenze, včetně fyziologického roztoku a pufovaných médií. Parenterální vehikula zahrnují roztok chloridu sodného, Ringerovu dextrózu, dextrózu a chlorid sodný, Ringerův roztok s laktátem nebo pevné oleje. Intravenózní vehikula zahrnují tekuté a výživné doplňky, elektrolytové doplňky (jako ty založené na Ringerově dextróze) apod. Mohou být také přítomny konzervační prostředky a další aditiva jako například antimikrobiální činidla, antioxidační činidla, chelatotvorná činidla a inertní plyny apod. Navíc, farmaceutický přípravek podle předkládaného vynálezu může zahrnovat proteinové nosiče, jako např. sérový albumin nebo imunoglobulin, výhodně lidského původu. Kromě toho je doporučeno, aby farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahoval další biologicky činný přípravek podle zamýšleného použití farmaceutického přípravku. Takové agens může být lék působící na gastrointestinální systém, lék působí jako

cytostatikum, lék zabraňující hyperurikémií a/nebo molekuly současně stimulující T lymfocyty nebo v oboru známé cytokiny.

Předkládaný vynález předpokládá, že různé polynukleotidy a vektory podle vynálezu jsou podávány buď samotně nebo v jakékoliv kombinaci s použitím standardních vektorů a/nebo systémů pro podávání genů, a volitelně spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo excipientem. Po podání mohou být uvedené polynukleotidy nebo vektory trvale integrovány do genomu pacienta.

Naproti tomu mohou být používány virové vektory, které jsou specifické pro určité buňky nebo tkáně a v uvedených buňkách perzistují. Vhodné farmaceutické nosiče a excipienty jsou v oboru dobře známy. Farmaceutické přípravky připravené podle vynálezu mohou být používány pro prevenci nebo léčbu nebo oddálení různých chorob týkajících se imunodeficitů a malignit se vztahem k B lymfocytům.

Kromě toho je možné použít farmaceutický přípravek podle vynálezu, který obsahuje polynukleotid nebo vektor podle vynálezu v genové terapii. Vhodné systémy pro podávání genů zahrnují lipozomy, systémy pro podávání zprostředkované receptory, nechráněnou DNA a virové vektory, jako jsou například herpes viry, retroviry, adenoviry a adeno-asociované viry. Dodání nukleových kyselin na specifické místo v organismu při genové terapii může být také uskutečněno použitím biolistického systému pro přenos nukleové kyseliny, jako například systém popsán autorem Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2726-2729, 1991). Další metody pro podávání nukleových kyselin zahrnují genový přenos zprostředkovaný částicemi, jak popsáno např. autorem Verma (Gene Ther., 15, 692-699, 1998). Rozumí se, že zavedené polynukleotidy a vektory exprimují genový produkt po zavedení do uvedené buňky a v tomto stavu výhodně zůstávají po dobu života uvedené buňky. Například, buněčné linie, které trvale

exprimují polynukleotid při řízení vhodnou regulační sekvencí, mohou být konstruovány podle metod odborníkovi dobře známých. Spíše než použitím expresních vektorů obsahujících virové počátky replikace, jsou hostitelské buňky transformovány polynukleotidem podle vynálezu a markerem pro selekci, buď ve stejném nebo samostatném plazmidu. Po zavedení cizorodé DNA jsou zkonstruované buňky pěstovány po dobu 1-2 dny v obohacených médiích, a pak jsou přemístěny na selektivní média. Marker pro selekci v rekombinantním plazmidu propůjčí resistenci a umožní selekci buněk s trvale integrovaným plazmidem do svých chromozomů, které rostou a tvoří ložiska, která mohou být dále klonována a rozšířena do buněčných linií. Takto zkonstruované buněčné linie jsou také použitelné zejména pro screening a detekci sloučenin zapojených do např. interakcí B a T lymfocytů.

Může být použita celá řada selekčních systémů včetně např. thymidinkinázy viru herpes simplex (Wigler, Cell, 11, 223, 1977), hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 2026, 1962) a adeninfosforibosyltransferázy (Lowy, Cell, 22, 817, 1980) v tk-, hgprt- nebo aprt- buňkách, v daném pořadí, aniž by tento výčet byl omezující. Také může být používána rezistence k antimetabolitu, jako základ selekce s dhfr, který propůjčuje resistenci na metotrexát (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3567, 1980, O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527, 1981), gpt, který propůjčuje resistenci na kyselinu mykofenolovou (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2072, 1981), neo, který propůjčuje resistenci na aminoglykosid G-418 (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol., 150, 1, 1981), hygromycin, který propůjčuje resistenci na hygromycin (Santerre, Gene, 30, 147, 1984), nebo puromycin (pat, puromycin N-acetyltransferáza). Byly popsány další geny pro selekci, například trpB, který umožňuje buňkám využívat indol

místo tryptofanu, hisD, který umožňuje buňkám zužitkovat histinol místo histidinu (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8047, 1988), a ODC (ornitindekarboxyláza), která propůjčuje resistenci na inhibitor ornitindekarboxylázy, 2-(difluorometyl)-DL-ornitin, DFMO (McCologue, v: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed., 1987).

V dalším provedení se předkládaný vynález týká diagnostického přípravku obsahujícího kterýkoliv z výše popsaných polypeptidů, polynukleotidů nebo vektorů podle vynálezu a volitelných vhodných prostředků pro detekci.

Polypeptidy podle vynálezu jsou také vhodné pro použití v imunotestech, ve kterých mohou být použity v tekuté fázi nebo navázány na pevný nosič. Příklady imunotestů, které mohou používat polypeptid podle vynálezu, jsou kompetitivní a nekompetitivní imunotesty buď přímé nebo nepřímé. Příklady takových imunotestů jsou radioimunotest (RIA), sendvičový test (imunometrický test) a testování pomocí westernového přenosu (western blot).

Polypeptidy podle vynálezu mohou být vázány k mnoha různým nosičům a použity k izolaci buněk specificky navázaných na uvedený polypeptid. Příklady známých nosičů zahrnují sklo, polystyren, polyvinylchlorid, polypropylen, polyetylen, polykarbonát, dextran, nylon, amylózy, přirozenou a modifikovanou celulózu, koloidní kovy, polyakrylamidy, agarózu a magnetit. Pro účely vynálezu může být nosič buď rozpustný nebo nerozpustný.

Odborníkovi je známo mnoho různých značek a metod značení. Příklady značek, které mohou být použity v předkládaném vynálezu, zahrnují enzymy, radioizotopy, koloidní kovy, fluorescenční sloučeniny, chemiluminiscenční sloučeniny a bioluminiscenční sloučeniny, viz také provedení projednaná výše.

Předkládaný vynález se také týká použití polypeptidu, polynukleotidu a vektoru podle vynálezu popsaných výše pro přípravu farmaceutického přípravku pro léčení malignit B lymfocytů, autoimunitních chorob se vztahem k B lymfocytům nebo deplece B lymfocytů.

Nedávné klinické studie s přeměřovanou cytotoxickou aktivitou lidských T lymfocytů pomocí bispecifických protilátek prokázaly slibné výsledky v léčení refrakterní Hodgkinovy nemoci (33), karcinomu prsu a vaječníků (34-37) a maligního gliomu (38). S danými fakty

- že bsc protilátky díky své nízké molekulové hmotnosti usnadňují penetraci do nádoru (jak bylo prokázáno pro fragmenty Fab nebo Fv) (39), a

- že se očekává, že bsc protilátky sníží toxicitu záviselou na dávce a dávku omezující, tato toxicita je způsobena systémovým uvolněním cytokinů zprostředkovaným Fc částmi obvyklých bispecifických protilátek (40), a

- že dokonce intaktní monoklonální protilátka (namířená proti CD20) vedla k regresi nádoru v pokročilých stadiích NHL (41, 42),

se očekávalo - a skutečně bylo ukázáno - že polypeptidy podle vynálezu jsou zajímavé molekuly, které přispívají k dalšímu terapeutickému pokroku.

Ve výhodném provedení je tedy farmaceutický přípravek podle vynálezu používán pro léčení nehodgkinských lymfomů.

Rozmezí dávek při podávání polypeptidů, polynukleotidů a vektorů podle vynálezu je dost velké, aby vyvolalo žádoucí účinek, při kterém jsou zmírněny symptomy nemoci se vztahem k B lymfocytům. Dávkování by nemělo být tak velké, aby způsobilo podstatné nepříznivé vedlejší účinky, jako nežádoucí křížové reakce, anafylaktické reakce apod. Obecně, dávkování se bude měnit podle věku, stavu, pohlaví a stadia nemoci pacienta a může být určeno odborníkem. Není-li žádná

kontraindikace, může být dávkování upraveno jednotlivým lékařem. Předpokládá se, že rozmezí uvedené dávky je stanoveno např. 0,01 µg až 10 mg polypeptidu podle vynálezu. Obzvláště výhodné dávkování je 0,1 µg až 1 mg, ještě výhodnější je 1 µg až 100 µg a nejvýhodnější je dávkování 3 µg až 10 µg jak je např. ukázáno v připojeném příkladu 7.

Kromě toho se vynález týká způsobu pro rozpoznání sloučenin aktivujících nebo současně stimulujících T lymfocyt nebo pro rozpoznání inhibitorů aktivace a stimulace T lymfocytu, způsob zahrnuje

(a) pěstování CD19 pozitivních buněk (výhodně B lymfocytů) a T lymfocytů v přítomnosti polypeptidu podle vynálezu a, volitelně, v přítomnosti složky schopné poskytnout detekovatelný signál jako odpověď na aktivaci T lymfocytu testovanou sloučeninou v podmínkách umožňujících interakci sloučeniny s buňkami, a

(b) detekce přítomného nebo nepřítomného signálu vznikajícího interakcí sloučeniny s buňkami.

Toto provedení je obzvláště užitečné pro testování kapacity sloučenin coby současně stimulujících molekul. V tomto způsobu CD19 pozitivní buňka/B lymfocyt poskytne primární aktivační signál pro T lymfocyty, tudíž se vyhne klonotypovému receptoru T lymfocytu. Pak může být podle vynálezu určeno, která testovaná sloučenina je ještě potřebná pro skutečnou aktivaci T lymfocytu. Ve způsobu podle vynálezu CD19 pozitivní buňka/B lymfocyt působí jako stimulační buňka, která spojuje bispecifické molekuly, které jsou vázány k CD3 komplexům na povrchu stejného T lymfocytu. Biologické způsoby pro pěstování, detekci a volitelně i testování jsou odborníkovi jasné.

Termín "sloučenina" ve způsobu podle vynálezu zahrnuje jednu látku nebo velké množství látek, které mohou nebo nemusí být totožné.

Uvedená sloučenina(y) může být například obsažena ve vzorcích např. buněčných extraktů z např. rostlin, zvířat nebo mikroorganismů. Kromě toho uvedené sloučeniny mohou být v oboru známy, ale až dosud nebylo zřejmé, že jsou schopné inhibovat aktivaci T lymfocytu nebo že jsou použitelné jako současně stimulující faktor T lymfocytu. Mnoho sloučenin může být např. přidáno do kultivačního média nebo vstříknuto do buňky. Jestliže vzorek obsahující sloučeninu(y) je identifikován způsobem podle vynálezu, pak je buď možné izolovat sloučeninu z původního vzorku, když je určeno, že obsahuje příslušnou sloučeninu nebo původní vzorek může být dále rozdělen, například jestliže se skládá z velkého množství různých sloučenin, aby se zredukoval počet různých látek ve vzorku a způsob se dále opakuje s částmi původního vzorku. Jestli uvedený vzorek nebo sloučenina projevují požadované vlastnosti pak může být určeno pomocí metod v oboru známých, jako například popsanych zde a v připojených příkladech. V závislosti na složitosti vzorků mohou být výše popsané kroky provedeny několikrát, výhodně až dokud vzorek určený způsobem podle vynálezu obsahuje pouze omezený počet látek nebo pouze jednu látku. Uvedený vzorek výhodně zahrnuje látky podobných chemických a/nebo fyzikálních vlastností a nejvýhodněji jsou uvedené látky totožné. Způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být docela dobře prováděny a navrženy odborníkem například ve shodě s jinými testy založenými na buňkách, které jsou popsány ve stavu techniky nebo použitím a modifikací metod, jak je popsáno v připojených příkladech. Kromě toho odborník hned pozná, které další sloučeniny a/nebo buňky mohou být použity pro provádění způsobů podle vynálezu, například interleukiny nebo enzymy, bude-li to nezbytné, které konvertují určitou sloučeninu na prekursor, který dále stimuluje nebo potlačuje aktivaci T lymfocytu. Takové adaptace způsobu podle vynálezu

jsou ve schopnostech odborníka a mohou být prováděny bez nadbytečného experimentování.

Sloučeniny, které mohou být použity ve shodě se způsobem podle předkládaného vynálezu, zahrnují peptidy, proteiny, nukleové kyseliny, protilátky, malé organické molekuly, ligandy, peptidomimetika, PNA apod. Uvedené sloučeniny mohou také být funkčními deriváty nebo analogy známých aktivátorů nebo inhibitorů T lymfocytů. Způsoby přípravy chemických derivátů a analogů jsou odborníkovi dobře známy a jsou popsány například autorem Beilstein (Handbook of Organic Chemistry, Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 U.S.A. and Organic Synthesis, Wiley, New York, USA). Kromě toho uvedené deriváty a analogy mohou být testovány na své působení podle způsobů v oboru známých nebo jak je popsáno například v připojených příkladech. Mimoto mohou být použita peptidomimetika a/nebo počítačem navržené vhodné aktivátory nebo inhibitory aktivace T lymfocytu například podle způsobů popsaných níže. Mohou být použity vhodné počítačové programy pro identifikaci interaktivních míst předpokládaného inhibitoru a antigenu podle vynálezu při vyhledávání komplementárních strukturálních motivů prostřednictvím počítače (Fassina, Immunomethods, 5, 114-120, 1994). Další vhodné počítačové systémy pro návrhy proteinů a peptidů pomocí počítače jsou popsány ve stavu techniky například autory Berry (Biochem. Soc. Trans., 22, 1033-1036, 1994), Wodak (Ann. N.Y. Acad. Sci., 501, 1-13, 1987), Pabo (Biochemistry, 25, 5987-5991, 1986). Výsledky získané z výše popsaných počítačových analýz mohou být použity v kombinaci se způsobem podle vynálezu pro např. optimalizaci známých aktivátorů nebo inhibitorů T lymfocytů. Vhodná peptidomimetika mohou také být identifikována syntézou peptidomimetických kombinatorických knihoven prostřednictvím postupné chemické modifikace a testování výsledných sloučenin

např. podle metody popsané na tomto místě a v připojených příkladech. Způsoby pro tvoření a použití peptidomimetických kombinatorických knihoven jsou popsány ve stavu techniky například autory Ostresh (Methods in Enzymology, 267, 220-234, 1996) a Dorner (Bioorg. Med. Chem., 4, 709-715, 1996). Kromě toho trojrozměrné a/nebo krystalografické struktury inhibitorů nebo aktivátorů interakce B lymfocyt/T lymfocyt mohou být použity pro návrh peptidomimetických inhibitorů nebo aktivátorů aktivace T lymfocytu, které jsou testovány způsobem podle vynálezu (Rose, Biochemistry, 35, 12933-12944, 1996, Rutenber, Bioorg. Med. Chem., 4, 1545-1558, 1996).

Stručně řečeno, předkládaný vynález poskytuje způsoby identifikace sloučenin, které jsou schopné modulovat imunitní reakce zprostředkované B lymfocytem/T lymfocytem.

Sloučeniny, u kterých je zjištěno, že aktivují reakce zprostředkované B lymfocytem/T lymfocytem, mohou být použity pro léčení karcinomů a příbuzných nemocí. Navíc může být také možné specificky inhibovat virové choroby, a tím zabránit virové infekci nebo šíření viru. Sloučeniny identifikované jako supresory aktivace nebo stimulace T lymfocytu mohou být použity při orgánové transplantaci, aby zabránily rejekci štěpu, viz také výše.

Je tudíž očekáváno, že sloučeniny identifikované nebo získané způsobem podle předkládaného vynálezu budou velice užitečné pro diagnostiku a především pro léčebné aplikace. Proto se v dalším provedení vynález týká způsobu produkce farmaceutického přípravku obsahujícího formulaci sloučenin identifikovaných v kroku (b) výše popsaného způsobu podle vynálezu ve farmaceuticky přijatelné formě. Kromě toho se předpokládá, že uvedená složka může být modifikovaná pomocí peptidomimetika. Způsoby tvoření a použití peptidomimetických kombinatorických knihoven jsou popsány ve stavu techniky například autoři Ostresh (Methods in Enzymology, 267, 210-

234, 1996), Dorner (Bioorg. Med. Chem., 4, 709-715, 1996), Beeley (Trends Biotechnol., 12, 213-216, 1994) nebo al-Obeidi (Mol. Biotech., 9, 205-223, 1998).

Léčebně použitelné sloučeniny identifikované způsobem podle vynálezu mohou být pacientovi podávány prostřednictvím jakéhokoli vhodného způsobu pro konkrétní sloučeninu např. perorálně, intravenózně, parenterálně, transdermálně, přes sliznice nebo pomocí chirurgického zákroku nebo implantátu (např. sloučenina je ve formě pevné nebo polotuhé biologicky kompatibilní a resorbovatelné matrix) v místě, kde je žádoucí působení sloučeniny nebo blízko tohoto místa. Příslušné léčebné dávky jsou určeny odborníkem, viz výše.

Kromě toho předkládaný vynález poskytuje způsob pro léčení malignit B lymfocytů, autoimunitních chorob se vztahem k B lymfocytům nebo deplece B lymfocytů a/nebo způsob oddalující patologický stav, který je vyvolaný poruchami B lymfocytů, tento způsob zahrnuje zavedení polypeptidu, polynukleotidu nebo vektoru podle vynálezu do savce postiženého uvedenou malignitou, nemocí a/nebo patologickým stavem. Kromě toho je výhodný, že uvedený savec je člověk.

Toto a další provedení jsou popsána a obsažena v popisu a příkladech předkládaného vynálezu. Další literatura týkající se jakékoliv protilátky, způsobu, použití a sloučenin pro použití podle předkládaného vynálezu, může být vyhledána ve veřejných knihovnách a databázích, s použitím například elektronických zařízení. Například může být využita veřejná databáze "Medline", která je dosažitelná na Internetu například pod adresou:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>.

Další databáze a adresy, jako například:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,

<http://www.infobiogen.fr/>,

http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html,

<http://www.tigr.org/>,
jsou odborníkovi známy a mohu také být získány použitím např.
<http://www.lycos.com>.

Přehled patentových informací v biotechnologii a přehled důležitých zdrojů patentových informací použitelných pro retrospektivní hledání a pro přehled o současných znalostech je podán v práci autora Berks (TIBTECH, 12, 352-364, 1994).

Popis obrázků

Obrázek 1: SDS-PAGE: barvení Coomassie modří purifikovaného bscCD19xCD3 fragmentu s různými množstvími proteinu. Molekulová hmotnost (kD) standardu je vyznačená nalevo.

Obrázek 2: FACS-analýza s bscCD19xCD3 (200 µg/ml) v různých CD19-pozitivních B buněčných liniích (BJAB, SKW6.4, Blin-1, Daudi, Raji), v CD19-negativní B buněčné linii BL60 a s CD3-pozitivními buňkami Jurkat a primárními lidskými PBMC. Přerušované čáry označují negativní kontroly.

Obrázek 3: Cytotoxicita bscCD19xCD3 v testu uvolňování ⁵¹Cr s nestimulovanými lidskými PBMC a různými B buněčnými liniemi. Poměr efektor:cílová buňka (poměr E:T) byl 10:1, doba inkubace 4 hodiny. Směrodatná odchylka ve všech trojích opakováních byla pod 7%.

Obrázek 4: Test cytotoxicity pomocí uvolňování chrómu s nestimulovanými primárními lidskými PBL proti plasmacytomovým buněčným liniím L363 a NCI a lymfomové buněčné linii Daudi, poměr E:T 20:1, doba inkubace 8 hodin.

Obrázek 5: Inhibice cytotoxicity bscCD19xCD3 základní anti-CD19 protilátkou v testu uvolňování chrómu, doba inkubace 8 hodin, poměr E:T 20:1, koncentrace bscCD19xCD3 1 ng/ml.

Obrázek 6: Test cytotoxicity s nestimulovanými PBMC proti buňkám Daudi po přidávání stoupajícího množství EGTA, poměr E:T 10:1, doba inkubace 4 hodiny.

Obrázek 7: cytotoxicita bscCD19xCD3 v testu uvolňování ^{51}Cr s nestimulovanými lidskými PBMC a buňkami Blin-1 jako cílovými buňkami při různých poměrech E:T, doba inkubace 4 hodiny, koncentrace konvenční bispecifické protilátky 3 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace bsc 17-1AxCD3 100 ng/ml, E:T poměr jak uvedeno.

Obrázek 8: DNA sekvence a proteinová sekvence bscCD19xCD3 protilátky (varianta obsahující značku FLAG). Čísla udávají pozice nukleotidů (nt), odpovídající aminokyselinová sekvence je zobrazena pod nukleotidovou sekvencí. DNA sekvence kódující bispecifickou protilátku začíná v pozici 1 a končí v pozici 1593. Prvních šest nt (pozice -10 až -5) a posledních šest nt (pozic 1596 až 1601) obsahuje štěpná místa restričních enzymů EcoRI a SalI, v tomto pořadí. Nukleotidy 1 až 57 specifikují vedoucí sekvenci, nukleotidy 82 až 414 a 460 až 831 kódují $V_L\text{CD19}$ a $V_H\text{CD19}$, v tomto pořadí, nukleotidy 847 až 1203 a 1258 až 1575 kódují $V_H\text{CD3}$ a $V_L\text{CD3}$, v tomto pořadí, a nukleotidy 1576 až 1593 kódují značku His.

Obrázek 9: Deplece primárních (maligních) CD19+ B lymfocytů odváděním autologních primárních T lymfocytů prostřednictvím bscCD19xCD3.

A) výchozí-bod ($t = 0$): $n = 3 \times 10^6$ PBL/jamku bylo vyseto na 24-jamkovou tkáňovou kultivační misku v objemu 1 ml

média RPMI 1640, doplněného 10% FCS. Je ukázáno počáteční procento CD19⁺ B lymfocytů, jakož i CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů.

B-G) relativní počty B a CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů po $t = 5$ dnech inkubace v 37°C/5% CO₂ v nepřítomnosti (B-C) nebo přítomnosti (D-G) bscCD19xCD3 (koncentrace jsou ukázány) se 60 U/ml IL-2 nebo bez něj. Negativní kontroly obsahovaly buď bispecifickou jednořetězcovou protilátku (17-1AxCD3) s irelevantní specifitou pro cílovou buňku nebo neobsahovaly žádnou bispecifickou protilátku (C).

Obrázek 10: Purifikační kroky pro bscCD19xCD3.

Obrázek 11: SDS-PAGE analýza čistoty bscCD19xCD3. Je ukázán SDS-polyakrylamidový gel s 4-12% gradientem barvený koloidní Coomassie modří. Dráhy 1 a 6, standardy molekulové velikosti, dráha 2, supernatant buněčné kultury, dráha 3, aktivní frakce z kationtové výměnné chromatografie, dráha 4, aktivní frakce z afinitní chromatografie s cheláty kobaltu, dráha 5, aktivní frakce z gelové filtrace. Bylo analyzováno stejné množství proteinu (2 µg) ze supernatantu buněčné kultury a různé frakce z kolon. Velikost standardů molekulové hmotnost v kD je ukázána napravo. Šipka ukazuje pozici bscCD19xCD3.

Obrázek 12: Kationtová výměnná chromatografie bscCD19xCD3. Koncentrace proteinu byla měřena pomocí absorpce ve 280 nm (mAU, vlevo). Eluční profil proteinu je ukázán plnou čarou. Profil stupňovitého gradientu NaCl je vyznačen přímkou plnou čarou (%B, vpravo) a sebrané frakce jsou označeny přerušovanými čarami. bscCD19xCD3 byla detekována ve frakci F6.

Obrázek 13: Afinitní chromatografie s cheláty kobaltu bscCD19xCD3. Koncentrace proteinu byla měřena pomocí absorpce

ve 280 nm (mAU, vlevo). Eluční profil proteinu je ukázán plnou čarou. Imidazolový gradient je vyznačen přímou plnou čarou (%B, vpravo) a sebrané frakce jsou označeny přerušovanými čarami. bscCD19xCD3 byla detekována ve frakci F7.

Obrázek 14: Gelová filtrace anti-CD19XANTI-CD3. Koncentrace proteinu byla měřena pomocí absorpce ve 280 nm (mAU, vlevo). Eluční profil proteinu je ukázán plnou čarou. Přerušované čáry označují sebrané frakce. bscCD19xCD3 byla nalezena ve frakci F7 odpovídající molekulové velikosti přibližně 60 kD.

Obrázek 15: Hladiny gamaglutamyltransferázy (GGT) v krvi jako reakce na ošetření s bscCD19xCD3. GGT hodnoty byly určeny standardní klinickou biochemickou metodou a jsou vyjádřeny v jednotkách/l. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Obrázek 16: Ultrazvukové měření sleziny pacienta A-B.

A: Určení velikosti sleziny datované 12. dubna, 1999, před léčbou bscCD19xCD3. Obrázek ukazuje zvětšenou slezinu (velikost 146 mm x 69,2 mm), což je zaviněno infiltrací maligními B lymfocyty.

B: Určení velikosti sleziny datované 16. dubna, 1999, po léčbě 3 µg 14. dubna, následovanými 10 µg 15. dubna. Obrázek ukazuje zmenšování sleziny na velikost 132 mm x 58,9 mm způsobené systémovou léčbou s bscCD19xCD3. Nesrovnalosti jednotlivých měření velikosti ukázaných v tabulce 1 jsou vysvětlené určováním velikosti orgánu v různých prostorových rovinách na základě ultrazvukového vyšetření. Tyto dva rozměry jsou označeny (+) a (x).

Obrázek 17: Počty leukocytů v krvi jako odpověď na léčbu s bscCD19xCD3. Počet leukocytů je uveden v 10^9 /litr. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Obrázek 18: Hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) v krvi jako odpověď na léčbu s bscCD19xCD3. CRP hodnoty byly určeny standardní klinickou biochemickou metodou a jsou vyjádřeny v mg/dl. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Obrázek 19: Hladiny nádorového nekrotického faktoru-alfa (TNF) v krvi jako odpověď na léčbu s bscCD19xCD3. TNF hodnoty byly určeny pomocí testu ELISA a jsou vyjádřeny v ng/ml. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Obrázek 20: Hladiny interleukinu-6 (IL-6) v krvi jako odpověď na léčbu s bscCD19xCD3. IL-6 hodnoty byly určeny pomocí testu ELISA a jsou vyjádřeny v pg/ml. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Obrázek 21: Hladiny interleukinu-8 (IL-8) v krvi jako odpověď na léčbu s bscCD19xCD3. IL-8 hodnoty byly určeny pomocí testu ELISA a jsou vyjádřeny v pg/ml. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých

dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Obrázek 22: hladiny alfa řetězce rozpustného receptoru interleukinu-2 (IL-2R) v krvi jako odpověď na léčbu s bscCD19xCD3. IL-2R hodnoty byly určeny pomocí testu ELISA a jsou vyjádřeny v jednotkách/ml. Časová osa ukazuje dny (d) od začátku prvního podání léku a hodiny (h) po jednotlivých dalších podáních léku, začínajíc nulou. Šipky označují časové body podávání léku.

Vynález bude nyní podrobněji popsán a vysvětlen prostřednictvím následujících biologických příkladů, které jsou pouze ilustrující a rozsah předkládaného vynálezu nijak neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Klonování variabilních (V) imunoglobulinových domén

Domény V lehkého řetězce (VL) a V těžkého řetězce (VH) z hybridomu HD37 (22) byly klonovány podle standardní PCR (polymerázová řetězová reakce) metody (23). cDNA syntéza byla prováděna s oligo-dT primery a Taq polymerázou.

Seznam primerů

5' L1:

GAAGCACGCGTAGATATCKTGMTSACCCAA [sekvence id. č. 1]

3' K:

GAAGATGGATCCAGCGGCCGCAGCATCAGC [sekvence id. č. 2]

5' H1:

CAGCCGGCCATGGCGCAGGTSCAGCTGCAG [sekvence id. č. 3]

3' G:

ACCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGG [sekvence id. č. 4]

5' VLB5RRV:

AGGTGTACACTCCATATCCAGCTGACCCAG [sekvence id. č. 5]

3' VLGS15:

GGAGCCGCCGCCGCGCCAGAACCACCACCTTT [sekvence id. č. 6]

5' VHGS15:

GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG

[sekvence id. č. 7]

3' VHBspEI:

AATCCGGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCT [sekvence id. č. 8]

Pro amplifikaci V domén prostřednictvím PCR byly použity primery 5' L1 a 3' K, ohraničující doménu V_L, a 5' H1 a 3' G pro těžký řetězec založený na primerech popsaných Dübel et al. (24).

CDNA anti-CD3 scFv fragmentu laskavě poskytl A. Traunecker (25).

Příklad 2

Konstrukce bispecifických jednořetězcových fragmentů a eukaryotická exprese

Aby byl získán anti-CD19 scFv-fragment, odpovídající VL- a VH-oblasti klonované do samostatných plazmidových vektorů sloužily jako templáty pro VL- a VH-specifickou PCR používající páry oligonukleotidových primerů 5' VLB5RRV/3' VLGS15 a 5' VHGS15/3' VHBspEI, v tomto pořadí. Tím byly vloženy překrývající se komplementární sekvence do PCR produktů, které byly spojeny za vzniku kódující sekvence

15-aminokyselinové (Gly₄Ser₁)₃ spojky během následující fúzní PCR. Tento amplifikační krok byl proveden s párem primerů 5' VLB5RRV/3' VHBspEI a výsledný fúzní produkt (nebo spíše anti-CD19 scFv-fragment) byl štěpen restrikcí enzymy EcoRV a BspEI, a tak klonován do vektoru BluescriptKS- (Stratagene) obsahujícím buď (EcoRI/SalI-klonovanou) kódující sekvenci anti-17-1A/anti-CD3 bispecifické jednořetězcové protilátky s N-koncovou značkou FLAG [1] nebo sekvenci modifikované verze bez epitopu FLAG (21), čímž byla nahrazena anti-17-1A-specifita specifitou anti-CD19 a uchována 5 aminokyselinová (Gly₄Ser₁)₁ spojka spojující C-koncový anti-CD3 scFv fragment, v daném pořadí. Pak byly DNA fragmenty kódující obě verze anti-CD19/anti-CD3 bispecifických jednořetězcových protilátek s uspořádáním domény VL_{CD19}-VH_{CD19}-VH_{CD3}-VL_{CD3} subklonovány EcoRI/SalI do popsaného expresního vektoru pEF-DHFR [1], podle pořadí. Výsledné plazmidové DNA byly transfekovány do DHFR-deficitních CHO lymfocytů pomocí elektroporace: selekce, genová amplifikace a produkce proteinu byla prováděna jako popsáno [1]. V následujících příkladech jsou vysvětlené výsledky získané s verzí bscCD19xCD3 obsahující FLAG.

Purifikace bscCD19xCD3 ze supernatantu transfekovaných CHO buněk poskytla 4 mg na litr tkáňového supernatantu. Bsc-Ab byla purifikována prostřednictvím své C-koncové histidinové značky pomocí afinitní chromatografie na koloně Ni-NTA, jak je popsáno [1]. Bsc-Ab byla eluována z kolony Ni-NTA jako zřetelný vrchol při imidazolu v 200mM koncentraci. SDS-PAGE byla prováděna podle Laemmli (26) s 12% gelem, a pak následovalo barvení Coomassie brilliantovou modří R250 pro analýzu purifikace bsc-Ab. Výsledky analýzy SDS-PAGE (obr. 1) ukazují předpokládanou velikost bsc-Ab (60 kD).

Příklad 3

Vazebné vlastnosti bsc-AbCD19xCD3

Vazebné specifity bsc-Ab pro CD3 a CD19 byly prokázány pomocí analýzy průtokovou cytometrií na CD3-pozitivních buňkách Jurkat, lidských PBMC a několika různých CD19-pozitivních buněčných liniích lymfomů z B lymfocytů, včetně Blin I, SKW6.4, Daudi, BJAB a Raji. CD19-pozitivní B buněčné linie Daudi, Raji, BJAB (Burkittův lymfom), SKW6.4 (lidské B lymfocyty transformované EBV) a Blin-1 (linie pre-B lymfocytů) byly použity pro analýzu průtokovou cytometrií a testy uvolňování chrómu. Jurkat je CD3-pozitivní buněčná linie T lymfocytů, BL60 a plasmocytomové buněčné linie NCI a L363 jsou negativní na obě povrchové molekuly, CD3 a CD19. Buněčné linie byly pěstovány v kompletním RPMI 1640 (Biochrom) s 10% FCS (GIBCO).

1×10^6 buněk bylo promyto PBS, resuspendováno ve 200 μ l PBS s 10 % Vernimmun (Centeon, Marburg, Německo) a 0,1 % NaN_3 a inkubováno 30 minut ve 4°C. Po centrifugaci (100 x g, 5 minut) byly buňky inkubovány v 50 μ l bscCD19xCD3 (200 μ g/ml v PBS s 10 % Venimmun a 0,1 % NaN_3) 30 minut ve 4°C. Buňky byly dvakrát promyty PBS. Pro detekci bsc-Ab byla použita protilátka proti značce His (Dianova) konjugovaná s FITC. Jako negativní kontroly sloužily irelevantní bsc-Ab 17-1AxCD3, produkovaná pomocí stejného expresního systému jako bscCD19xCD3, nebo protilátka proti samotné značce His. Průtoková cytometrie byla prováděna na přístroji Becton Dickinson FACScan. U buněk BL60, které neexprimují ani CD19 ani CD3, nebyla zjištěna žádná vazba (obr. 2).

Příklad 4

Cytotoxická aktivita bsc-AbCD19xCD3 proti CD19-pozitivním lymfomovým buňkám

V testu uvolňování ^{51}Cr se ukázalo, že protilátka bscCD19xCD3 je vysoce cytotoxická pro některé lymfomové buněčné linie (obrázek 3). Lidské mononukleární buňky periferní krve (PBMC), jakožto efektorové buňky, byly izolovány z čerstvě sražených leukocytů („buffy coat“) náhodných dárců gradientovou centrifugací s použitím LymphoprepTM (Nycomed) s následující centrifugací 100 x g pro odstranění trombocytů. CD19-pozitivní B lymfocyty byly odčerpány použitím Dynabeads® M-450 CD19 (Dyna). Ochuzené buněčné populace byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie (Becton Dickinson), která ukázala 99% depleci CD19-pozitivních buněk. PBMC byly inkubovány přes noc ve 37°C, 5% CO₂, jako cílové buňky byly použity CD19-pozitivní B buněčné linie (Raji, Blin I, Daudi, BJAB, SKW6.4).

Cytotoxicita byla měřena ve standardním testu uvolňování chrómu na 96-jamkových destičkách s kulatým dnem (Nunc) s použitím kompletního média RPMI 1640 (Biochrom) s 10% FCS (GIBCO).

Nestimulované PBMC byly přidány v objemu 80 µl média do každé jamky obsahující 20 µl bsc-Ab v různých koncentracích. Pak bylo přidáno 100 µl cílových buněk (1×10^4) značených ^{51}Cr , destičky byly stočeny 3 minuty v 100 x g a inkubovány 4 hodiny ve 37°C, 5 % CO₂. Po další centrifugaci bylo odstraněno 50 µl supernatantu a testováno na uvolněný ^{51}Cr v počítači gama impulzů (TopCount, Canberra Packard).

Spontánní uvolňování bylo měřeno pomocí inkubace cílových buněk bez efektorových buněk nebo protilátek a maximální uvolňování bylo určováno pomocí inkubace cílových

buněk s 10% TritonX-100. Inkubace cílových buněk s bscAb bez efektorových buněk neměla za následek měřitelnou lýzi buněk. Procento specifické lýze bylo vypočítáno takto:
$$\text{nespecifické uvolňování (\%)} = \frac{(\text{cpm, experimentální uvolňování}) - (\text{cpm, spontánní uvolňování})}{(\text{cpm, maximální uvolňování}) - (\text{cpm, spontánní uvolňování})} \times 100.$$
 Všechny pokusy byly prováděny ve trojím opakování (triplikátech). SD mezi triplikáty byla ve všech experimentech pod 6%. Aby byly přiblíženy podmínky *in vivo* použili původci vynálezu jakožto efektorové buňky nestimulované PBMC od zdravých dárců. Rychlá indukce cytotoxicity během 4 hodin byla pozorována bez žádné předběžné stimulace T lymfocytů. Kontrolní bsc-protilátka s odlišnou nádorovou specifitou (bsc17-1AxCD3), ale vytvářena stejným systémem jako protilátka bscCD19xCD3, vykazala lyzační aktivitu nevýznamně vyšší než médium coby pozadí. Kromě toho nebyla pozorována žádná cytotoxická aktivita při použití plasmocytomových buněčných linií NCI a L363, které neexprimují CD19, jako cílových buněk (obrázek 4). V kompetitivních testech používajících stoupající množství CD19-specifické základní monoklonální protilátky HD37 byla cytotoxická aktivita bscCD19xCD3 téměř úplně blokována (obrázek 5). Tyto kontroly ukazují, že cytotoxický účinek zprostředkovaný bscCD19xCD3 je antigen-specifický. Pro získání více informací o molekulárním mechanismu, kterým bscCD19xCD3 protilátka ničí CD19-pozitivní cílové buňky, zkoušeli původci vynálezu blokovat cytotoxicitu zprostředkovanou bscCD19xCD3 prostřednictvím EGTA. Jak ukázáno na obrázku 6, cytotoxická aktivita bscCD19xCD3 může být úplně zablokována prostřednictvím EGTA, což ukazuje, že specifická lýze je spíše účinek zprostředkovaný T lymfocyty (pravděpodobně přes metabolickou dráhu perforinu) než přímé působení protilátky samotné (např. indukce apoptózy).

Při použití nestimulovaných T lymfocytů byl pozorován významný cytotoxický účinek proti buňkám Blin I dokonce při koncentracích protilátky pod 1 ng/ml (obrázek 7). Dokonce při poměrně nízkém poměru E:T (5:1, 2,5:1) a při velmi nízké koncentraci protilátky 10 až 100 pg/ml, protilátka bscCD19xCD3 rychle indukovala specifickou cytotoxickou aktivitu nestimulovaných T lymfocytů (obrázek 7). Na rozdíl od toho, konvenční bispecifická protilátka CD19XCD3 vytvořená pomocí techniky hybridu-hybridomu (5-7, 27) nevykázala v těchto podmínkách významnou cytotoxickou aktivitu ani při koncentracích až 3000 ng/ml (obrázek 7). Tato konvenční bispecifická protilátka vyžadovala další předběžnou stimulaci T lymfocytů a vysoké koncentrace protilátek přibližně 100 ng/ml, aby indukovala cytotoxicitu specifickou pro T lymfocyty (neukázáno), což je v soulase s literaturou (5-7, 27).

Příklad 5

Deplece primárních (maligních) B lymfocytů prostřednictvím autologních T lymfocytů přes cytotoxickou aktivitu bscCD19xCD3

Aby se určila cytotoxická aktivita bscCD19xCD3 na primární maligní B lymfocyty, mononukleární buňky periferní krve (PBMC) pacienta nemocného B CLL (chronická lymfatická leukémie typu B) byly izolovány pomocí centrifugace na hustotním gradientu Ficollu. Tyto buňky byly nepřetržitě pěstovány v přítomnosti nebo nepřítomnosti bscCD19xCD3 po dobu 5 dnů ve 37°C/5% CO₂ v médiu RPMI 1640 doplněném 10% FCS a, volitelně, 60 U/ml IL-2. Analýza průtokovou cytometrií odhalila, že lymfocyty periferní krve (PBL) tohoto konkrétního pacienta (který byl později systémově léčen

s bscCD19xCD3, viz příklad 7) s NHL (nehodgkinský lymfom) obsahovaly 92,6 % CD19-pozitivních B lymfocytů (=cílové buňky) a 7,4 % CD3-pozitivních T lymfocytů (=efektorové buňky) při poměru T lymfocytů CD4/CD8 2,6 : 4,8. Převážná většina těchto CD19-pozitivních B lymfocytů se skládala z maligních buněk. Na 24-jamkové tkáňové kultivační destičky byl vyseto 3×10^6 PBL/ml na jamku v objemu 1 ml. Jako negativní kontroly sloužilo kultivační médium plus IL-2 a kultivační médium plus IL-2 s irelevantní bispecifickou jednořetězcovou protilátkou bsc17-1AxCD3 (1) v koncentraci 0,5 µg/ml. Jak je ukázáno na obrázku 9, po 5 dnech inkubace nebyla v těchto podmínkách zjištěna deplece CD19-pozitivních buněk. Ale když byla přidána bscCD19xCD3 v koncentracích 0,5 µg/ml nebo 0,05 µg/ml (buď v přítomnosti nebo nepřítomnosti IL-2), byly zničeny skoro všechny CD19-pozitivní B lymfocyty. Pěstované buňky se tehdy skládaly převážně z T lymfocytů s poměrem T lymfocytů CD4/CD8 asi 1:2 až 1:3. To ukázalo mimořádnou cytotoxicitu bscCD19xCD3 pro CD19-pozitivní B lymfocyty, protože úplná deplece primárních B lymfocytů autologními T lymfocyty byla indukována v koncentraci pouze 50 ng/ml při velmi nepříznivém počátečním poměru efektorových a cílových buněk (méně než 1:10), dokonce bez další stimulace T lymfocytů IL-2 nebo jiným druhem stimulace.

Příklad 6

Purifikace bscCD19xCD3 pro léčebné použití

bscCD19xCD3 byla produkována v buňkách vaječníků čínského křečka (CHO) trvale transfekovaných expresním vektorem (pEF-DHFR, viz příklad 2) kódujícím bscCD19xCD3 a kromě toho hexahistidin a značku FLAG. Buňky byly pěstovány

v médiu bez séra (Rencyte) v reaktoru s dutými vlákny (Unisyn). Pět set ml supernatantu buněčné kultury bylo odebráno a sterilováno filtrací přes 0,2 μ m filtr (AcroCap, Pall Gelman).

bscCD19xCD3 byla detekována a kvantifikována pomocí westernova přenosu s použitím myšího anti-FLAG IgG (Sigma) a koziho anti-myšího IgG konjugovaného s alkalickou fosfatázou (Sigma). Detekce byla prováděna pomocí chemiluminiscence s použitím systému BCIP/ NBT (Devitron). Koncentrace proteinu byly určeny pomocí Bradfordova testu (Biorad), s použitím bovinního IgG (Biorad) jako proteinového standardu. Čistota frakcí z kolon byla hodnocena redukující elektroforézou s dodecylsulfátem sodným (SDS) Bis/Tris polyakrylamidovým gelem s gradientem 4-12% (PAGE) používající systém s MOPS pufrem (Novex).

Purifikace bscCD19xCD3 do homogenity vyžaduje kationtovou výměnnou chromatografii, afinitní chromatografii s cheláty kobaltu a, jako závěrečný stupeň, gelovou filtraci. Tyto purifikační kroky byly prováděny s použitím standardních protokolů (viz níže). Proudové schéma purifikačního postupu je ukázáno na obrázku 10.

Kationtová výměnná chromatografie: Supernatant buněčné kultury z CHO buněk byl smíchán se dvěma objemy pufru C (30mM morfolinoetansulfonová kyselina [MES], 20 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,3 mM benzamidinhydrochlorid, pH 5,5) a puštěn přes 70 ml kationtovou výměnnou kolonu SP Sepharose Fast Flow (Pharmacia) při průtokové rychlosti 20 ml/minutu. Kolona byla ekvilibrována pufrem A (20 mM MES, 20 mM NaCl, pH 5,8). Po promytí 5 objemy kolony pufrem A byla bscCD19xCD3 eluována s gradientem 45% pufru B (20 mM MES, 1 M NaCl, pH 5,8) v pufru A. K eluátu bylo přidáno 0,045 objemu 1M Tris/HCL, pH 8,5, obsahujícího 47mM imidazolu a byl pak sterilován filtrací (0,2 μ m, AcroCap). Typický eluční profil kationtové

výměnné chromatografie je ukázán na obrázku 12. bscCD19xCD3 byla obsažena ve frakci 6.

Afinitní chromatografie s cheláty kobaltu: Eluát z kationtové výměnné kolony byl puštěn při průtokové rychlosti 2,5 ml/minutu přes 10 ml kolonu Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia) ekvilibrovanou pufrem AO (50 mM Na_2HPO_4 , 400 mM NaCl, pH 8,0). Kolona byla předem ekvilibrována s roztokem 0,1M chloridu kobaltu. Po promytí s 33 objemy kolony pufrem AO, pufrem A (50mM Na_2HPO_4 , 400mM NaCl, 2mM imidazol, pH 6,4) a gradientem od 0 do 12 % pufru B (50mM Na_2HPO_4 , 400mM NaCl, 500mM imidazol, pH 6,4) v pufru A, byla bscCD19xCD3 eluována v jednom kroku 30 ml 100% pufru B. Eluát byl sterilován filtrací, po které následovala přibližně 10 násobná koncentrace v přístroji MacroSep (Pall Gelman, limit propustnosti 10 kD). Typický eluční profil afinitní chromatografie s cheláty kobaltu je ukázán na obrázku 13. bscCD19xCD3 byla detekována ve frakci číslo 7.

Gelová filtrace: Koncentrovaný eluát z kolony pro afinitní chromatografii s cheláty kobaltu byl nanesen při průtokové rychlosti 0,75 ml/minutu na 124 ml kolonu High Load Superdex 200 (Pharmacia, preparativní stupeň) ekvilibrovanou fyziologickým roztokem pufrovaným fosfáty (Gibco). bscCD19xCD3 byla eluována ve frakci s molekulovou velikostí odpovídající přibližně 55 kD (obrázek 14, frakce číslo 7). Frakce gelové filtrace obsahující bscCD19xCD3 byla doplněna 5% lidským sérovým albuminem (Behring) a pak následovala sterilizace filtrací přes 0,1 μm filtr (Millex, Millipore).

Velké množství bscCD19xCD3 v supernatantu buněčné kultury a různých aktivních frakcích z kolon, jak bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE, je ukázáno na obrázku 11. bscCD19xCD3 byl hlavní proteinový pás detekovaný v supernatantech buněčných kultur (dráha 2). Vysoce

purifikovaný anti-CD19xanti-CD3, který byl použit pro léčení lidí, nevykázal zjistitelné nečistoty (obr. 11, dráha 5).

Příklad 7

Klinické použití bscCD19xCD3 u pacienta s lymfomem pocházejícím z lymfocytů B

V soucitném použití byl pacient (A-B, žena, narozena 1937) trpící chronickou lymfatickou leukémií typu B (B CLL) léčen bispecifickou jednořetězcovou protilátkou bscCD19xCD3.

Pacientova anamnéza a zdůvodnění:

U pacienta byla diagnostikována B CLL v r. 1992. V době počáteční diagnózy nemoc postihla různé oblasti lymfatických uzlin a slezinu, kromě toho byla pozorována hemolytická anémie autoimunitního původu a deficit imunoglobulinů. Pacient má struma nodosa, která je dobře kontrolována a pacient je v eutyreoidním stavu díky léčení karbimazolem v dávce 2,5 mg/den.

Pacient byl od r. 1992 do r. 1994 léčen mnohonásobnými chemoterapeutickými cykly chlorambucilem a prednizonem. Po progresi nemoci byla léčba změněna na cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin a prednizon (CHOP, 8 cyklů) a bylo dosaženo remise trvající déle než jeden rok. Po novém relapsu pacient obdržel dalších 6 cyklů CHOP, následovaných léčbou chlorambucilem a prednizonem a jednu kúru samotným chlorambucilem, která nezpůsobila ústup nemoci. V prosinci 1998 bylo provedeno ozáření sleziny, aby se potlačila postupující splenomegalie pacienta. Pacient prodělal vážné snížení aktivity kostní dřeně s četnými infekčními komplikacemi. Pacientova anémie a trombocytopenie vyžadovala časté transfúze červených krvinek a substituci destiček.

U tohoto pacienta nebyla indikována útočnější chemoterapie nebo léčba vysokými dávkami pro pokročilý stupeň choroby a zhoršenou funkci kostní dřeně. Léčení s protilátkou anti-CD20 rituximabem nebylo vhodné, protože účinnost rituximabu u B CLL nebyla doposud jasně prokázána.

Analýza FACS odhalila, že 95 % buněk periferní krve pacienta byly CD19-pozitivní buňky, zatímco 77 % buněk exprimovalo antigen CD20. Inkubace buněk periferní krve pacienta s bscCD19xCD3 ukázala výraznou depleci CD19-pozitivních B lymfocytů (viz příklad 5). Proto lékaři rozhodli léčit pacienta s novou bscCD19xCD3 (soucitné použití). Pacient byl podrobně informován o novosti sloučeniny a o možném riziku a užitku této léčby. Pacient plně rozuměl vysvětlení a vyjádřil písemně informovaný souhlas s tímto soucitným použitím.

Popis klinického podávání:

Před začátkem léčby pacient podstoupil klinické vyšetření a četné diagnostické procedury, aby byl ověřen stupeň nemoci a aby byly vyloučeny jakékoliv další rizikové faktory. Pacient byl v dobrém klinickém stavu, co se týče anémie, trombocytopenie a ztráty hmotnosti, ale bez jakékoliv kardiovaskulární poruchy nebo jiných komplikací zabraňujících použití bscCD19xCD3. Během noci před prvními dny léčby měl pacient migrénu. Při podávání bscCD19xCD3 byl pacient hospitalizován na nemocničním oddělení v podmínkách intenzivní péče, aby bylo zajištěno rychlé léčení jakékoliv náhlé příhody, která by mohla nastat. Pro prevenci akutní cytokinové reakce a komplikací z lýze nádorových buněk dostal pacient profylaktické i.v. dávky 2 mg klemastinu (Tavegil®) a 200 mg cimetidinu (Tagamet®), jakož i 300 mg alopurinolu a 20 mg omeprazolu (Antra®).

V průběhu léčení a období dalšího sledování byla prováděna alkalizace a heparinizace. Kromě toho pacient dostával veškerou potřebnou symptomatickou léčbu.

Před podáváním léku a v průběhu léčení byly odebírány vzorky krve pro sledování biochemických, hematologických a imunologických ukazatelů.

První podávání bscCD19xCD3 (14. dubna 1999):

Pacient dostal první dávku 3 µg bscCD19xCD3 jako 20 minutovou infúzi v izotonickém fosfátovém pufru obsahujícím 5% lidský sérový albumin (HSA). Během infúze pacient nepociťoval žádné nepříznivé účinky. Přibližně 1 hodinu po infúzi měl pacient přibližně 5 minut třesavku, po které následovalo pocení, mírný pokles krevního tlaku o přibližně 10 mmHg a mírný vzestup tělesné teploty (+ 0,5 °C) po dobu několika hodin. Kromě toho se nepatrně zhoršily bolesti hlavy. Pacient byl léčen dalšími 2 mg Tavegilu® a 200 mg Tagametu®, 250 mg prednizolonu (Solu-Decortin®) a 50 mg pethidinu (Dolantin®). Všechny příznaky vymizely tentýž den bez následků.

Druhé podávání bscCD19xCD3 (15. dubna 1999):

Druhá dávka 10 µg bscCD19xCD3 byla podána den později za stejných podmínek. Přibližně 1 hodinu po infúzi měl pacient nápadnou třesavku, horečku (39,2 °C), mírnou hyperventilaci a hypotenzní reakci. Pacient byl léčen 2 mg Tavegilu, 200 mg Tagametu a 300 mg Solu-Decortinu a 15 mg piritramidu (Dipidolor®). Pro stabilizaci kardiovaskulárních funkcí dostal pacient infúzi dopaminu a objemovou substituci. Po této léčbě se příznaky výrazně zmenšily. Nicméně přesto byl pacient přemístěn přes noc na kardiologické oddělení, aby bylo zajištěno řádné sledování životních funkcí a v případě nutnosti okamžitá zákrok. Druhý den ráno byl pacient

přemístěn na normální nemocniční pokoj bez dalších komplikací.

Během dalších 3 dnů pacientovi přetrvávala subfebrilní teplota (přibližně 37,2 °C) a den později po druhé dávce se objevil menší pleurální výpotek (16. duben 1999) a mírný edém dolních končetin (duben 18. 1999). Kardiovaskulární činnost zůstala stabilní a laboratorní vyšetření neodhalilo mimořádné změny vzhledem k bezpečnému podání léku kromě zvýšení γ -glutamyltransferázy po druhé dávce bscCD19xCD3 (obrázek 15).

Protože bscCD19xCD3 byla pacientem tolerovaná a nepříznivé účinky byly zvládnuty symptomatickou léčbou, bude u tohoto pacienta pokračovat podávání nové bscCD19xCD3.

Klinická a imunologická účinnost bscCD19xCD3:

Klinické výsledky:

Ultrazvukové vyšetření sleziny a pěti abdominálních a axilárních lymfatických uzlin bylo provedeno jeden a čtyři dny po podávání druhé dávky bscCD19xCD3. Již jeden den po dávce 10 μ g (16. dubna 1999) vykazaly lymfatické uzliny, a také slezina, zmenšení přibližně o 20 % ve srovnání s výchozím hodnocením. Toto pozorování bylo potvrzeno při druhém ultrazvukovém vyšetření 19. dubna 1999. Hmotnost sleziny se zmenšila o 350 g (z 1630 g při výchozím hodnocení na 1280 g 19. dubna 1999) (tabulka 1, obrázek 16).

Hematologické výsledky:

Počet bílých krvinek, který zahrnoval z největší části maligní B lymfocyty, během léčebné kúry a ve dnech dalšího sledování klesl (tabulka 2, obrázek 17). C-reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze, který odráží aktivaci T lymfocytů a účinek prozánětlivých cytokinů. Po podání 10 μ g

bscCD19xCD3 se jeho hodnoty nápadně zvýšily, a pak během dalších 3 dnů pozorování následoval kontinuální pokles (tabulka 2, obrázek 18).

Imunologické výsledky:

Hladina sérových cytokinů, které odráží akutní imunologickou reakci na podávání sloučeniny, byla měřena před podáváním nové sloučeniny a v různých intervalech po podávání. Sérové hladiny cytokinů a rozpustného receptoru IL-2 byly měřeny kvantitativním testem ELISA podle instrukcí výrobce.

Nádorový nekrotický faktor TNF- α významně vzrostl způsobem závislým na dávce během první hodiny po podávání bscCD19xCD3 (obrázek 19).

Interleukin 6 (IL-6) a interleukin 8 (IL-8) také vykázaly významné zvýšení závislé na dávce. Jejich maximální hladiny byly pozorovány 2 až 4 hodiny po podávání bscCD19xCD3 (obrázky 20, 21). Všechny cytokiny se vrátily na výchozí hladinu během několika hodin.

Rozpustný receptor IL-2 byl zvýšený již při výchozím vyšetření, což může být vysvětleno tím, že masa maligních B lymfocytů exprimuje receptor IL-2. Po podávání nové bscCD19xCD3 bylo pozorováno zvýšení rozpustného receptoru IL-2, což ukazuje aktivaci efektorových buněk (obrázek 22).

Závěr:

Nová bscCD19-CD3 byla podávána bezpečně pacientovi trpícímu refrakterní B CLL. Snášitelnost bscCD19xCD3 v dávkách 3 μ g a 10 μ g byla přijatelná a může být dobře kontrolována pomocí profylaktických opatření a symptomatické léčby.

Nová bscCD19xCD3 způsobila zmenšení již předtím zvětšené sleziny a lymfatických uzlin pacienta, jak ukázáno při

vyšetření ultrazvukem. Protože zvětšení sleziny a lymfatických uzlin je způsobeno infiltrací maligními B lymfocyty, zmenšení odráží zničení maligních B lymfocytů jako následek podávání bscCD19xCD3.

V ostrém protikladu ke každé jiné bispecifické protilátce CD19XCD3 v oboru známé, bispecifická protilátka CD19XCD3 podle vynálezu (bscCD19xCD3) se projevila klinicky účinná u nehodgkinského lymfomu pocházejícího z B lymfocytů, jak měřeno zmenšením lymfoidních orgánů infiltrovaných maligními B lymfocyty. Ukázalo se, že bscCD19xCD3 je klinicky účinná výhodně v překvapivě nízkých dávkách, které jsou při systémovém podávání dobře tolerovány. Tudíž klinická účinnost bscCD19xCD3 potvrdila její výjimečnou cytotoxickou aktivitu, jak byla zjištěna *in vitro*.

Tabulka 1

Účinek bscCD19xCD3 na velikost lymfatických uzlin a sleziny pacienta s lymfomem pocházejícím z lymfocytů B.

<u>Ultrazvuková měření</u>			12.4.1999	16.4.1999	19.4.1999
lymfatické uzliny	abdominální	1	54x29x14 mm	42x30x13 mm	42x30x14 mm
		2	56x33x18 mm	43x33x18 mm	43x30x16 mm
		3	46x32x27 mm	46x31x22 mm	47x32x23 mm
	axilární	vlevo	36x24x16 mm	34x22x15 mm	30x22x14 mm
		vpravo	37x24x13 mm	33x20x11 mm	32x23x14 mm
slezina			270x146x69 mm	265x132x64 mm	265x128x63 mm
			1630 g	1340 g	1280 g

Velikost tří abdominálních lymfatických uzlin, jedné levé a jedné pravé axilární lymfatické uzliny a sleziny byla určena a měřena ultrazvukovým vyšetřením s použitím přístroje

Toshiba SSA100. Velikosti jsou uvedeny ve třech rozměrech a v mm. Hmotnost sleziny byla vypočítána z rozměrů a ultrazvukové hustoty.

Tabulka 2

Hladiny vybraných ukazatelů v krvi jako reakce na léčení s bscCD19xCD3.

		14.4. 1999	15.4. 1999	16.4. 1999	17.4. 1999	18.4. 1999	19.4. 1999
	jednotky						
GGT	U/l	22	24 (ráno) - (večer)	124 (6,00) 107 (12,00)	96	89	87
LDH	U/l	618	536 (ráno) 773 (večer)	548	697	551	539
Leukocyty	Gpt/l	46,8	43,3 (ráno) 22,3 (večer)	36,9	37,0	28,3	36,6
Lymfocyty	%	85	58,8 (ráno) 82,0 (večer)	60,9	64,4	65,5	88
CRP	mg/dl	< 0,4	1,0 (ráno) 0,7 (večer)	5,2	2,5	2,0	0,7

Hladiny gamaglutamyltransferázy (GGT), laktátdehydrogenázy (LDH) a C-reaktivního proteinu (CRP) v krvi byly určovány standardními metodami klinické biochemie a jsou vyjádřeny jako jednotky/ml (U/ml) (GGT), jednotky/l (U/ml) (LDH) a mg/dl (CRP). Počet leukocytů je vyjádřen v $10^9/l$ a počet lymfocytů je uvedený jako procento ze všech leukocytů. Výchozí hladiny 14. dubna 1999 před léčbou jsou udány na prvním řádku. Reakce na 3 μ g bscCD19xCD3 15. dubna (která byla podána 14. dubna) je ukázána na druhém řádku. Reakce na druhé podání 10 μ g sloučeniny tentýž den je ukázána na třetím řádku. Hladiny vyvolených ukazatelů čtyři dny po ošetření lékem jsou uvedeny na posledních čtyřech řádcích.

SEZNAM LITERATURY

1. Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7021-5, 1995.
2. Gianni, N Engl. J. Med. 336, 1290-7, 1997.
3. Urba, J. Natl. Cancer Inst. Monogr., 29-37, 1990.
4. Fisher, Cancer, 1994.
5. Bohlen, Blood, 82, 1803-121, 1993.
6. Bohlen, Cancer Res, 53, 18:4310-4, 1993.
7. Bohlen, Cancer Res, 57, 1704-9, 1997.
8. Haagen, Clin Exp Immunol, 90, 368-75, 1992.
9. Haagen, Cancer Immunol Immunother., 39, 391-6, 1994.
10. Haagen, Blood, 84, 556-63, 1994.
11. Haagen, Blood, 85, 3208-12, 1995.
12. Weiner, Leuk Lymphoma, 16, 199-207, 1995.
13. Csoka, Leukemia, 10, 1765-72, 1996.
14. Uckun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8603-7, 1988.
15. Staerz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1453-7, 1986.
16. Lanzavecchia, Eur J Immunol, 17, 105-11, 1987.
17. Mallender, J Biol Chem, 269, 199-206, 1994.
18. Gruber, J Immunol, 152, 5368-74, 1994.
19. Kostelny, J Immunol, 148, 1547-53, 1992.
20. Mack, J Immunol, 158, 3965-70, 1997.
21. Kufer, Cancer Immunol Immunother, 45, 193-7, 1997.
22. Pezzutto, J Immunol, 138, 2793-9, 1987.
23. Orlandi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833-7, 1989.
24. Dubel, J Immunol Methods, 175, 89-95, 1994.
25. Traunecker, Embo J, 10, 3655-9, 1991.
26. Laemmli, Nature, 227, 680-5, 1970.
27. Bohlen, J Immunol Methods, 173, 55-62, 1994.
28. Demanet, Int J Cancer Suppl, 7, 67-8, 1992.
29. De, J Hematother, 4, 433-7, 1995.
30. Haagen, Leuk Lymphoma, 19, 381-93, 1995.
31. Anderson, Blood, 80, 2826-34, 1992.

32. Zhu, *Int J Cancer*, 62, 319-24, 1995.
33. Hartmann, *Blood*, 89, 2042-7, 1997.
34. Valone, *J Clin Oncol*, 13, 2281-92, 1995.
35. Valone, *J Hematother*, 4, 471-5, 1995.
36. Bolhuis, *Int J Cancer Suppl*, 7, 78-81, 1992.
37. Canevari, *J Natl Cancer Inst*, 87, 1463-9, 1995.
38. Nitta, *Lancet*, 335, 368-71, 1990.
39. Yokota, *Cancer Res*, 52, 3402-8, 1992.
40. Weiner, *J Immunol*, 152, 2385-92, 1994.
41. Maloney, *Blood* 84, 2457-66, 1994.
42. Reff, *Blood* 83, 435-45, 1994.
43. Kipriyanov, *Int. J. Cancer*, 77, 763-772, 1998.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 36 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

GAAGCACGCG TAGATATCKT GMTSACCCAA WCTCCA

36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

GAAGATGGAT CCAGCGGCCG CAGCATCAGC

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 33 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché

- (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ano
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:
- CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT SCAGCTGCAG SAG 33

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 39 párů bazí
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ano
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:
- ACCAGGGGCC AGTGGATAGA CAAGCTTGGG TGTCGTTTT 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 36 párů bazí
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

AGGTGTACAC TCCATATCCA GCTGACCCAG TCTCCA

36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 48 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

GGAGCCGCCG CCGCCAGAAC CACCACCTTT GATCTCGAGC TTGGTCCC

48

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 48 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

GGCGGCGGCG GCTCCGGTGG TGGTGGTTCT CAGGTACTGC AGAGTCGG

48

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "oligonukleotid"

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

AATCCGGAGG AGACGGTGAC CGTGGTCCCT TGGCCCCAG 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1611 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: double
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) MOLECULE TYP: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE : 11..1603

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

GAATTCACCC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA 49

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr

1

5

10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC TAC AAA GAT GAT GAC GAT AAG GAT ATC 97

Ala Thr Gly Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Ile

15

20

25

01.12.00

65

CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG	145
Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg	
30 35 40 45	

GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT	193
Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp	
50 55 60	

AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC	241
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu	
65 70 75	

CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT	289
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe	
80 85 90	

AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG	337
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val	
95 100 105	

GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT	385
Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp	
110 115 120 125	

CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTC GAG ATC AAA GGT GGT GGT	433
Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly	
130 135 140	

GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT TCT CAG GTG CAG CTG	481
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu	
145 150 155	

CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT	529
Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile	
160 165 170	

TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG	577
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp	
175 180 185	

GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG 625
Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp
190 195 200 205

CCT GGA GAT GGT GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC 673
Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala
210 215 220

ACT CTG ACT GCA GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC 721
Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
225 230 235

AGC CTA GCA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG 769
Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu
240 245 250

ACT ACG ACG GTA GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA 817
Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
255 260 265

GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCC GGA GGT GGT GGA TCC GAT ATC AAA 865
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys
270 275 280 285

CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG 913
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
290 295 300

ATG TCC TGC AAG ACT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG CAC 961
Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
305 310 315

TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT 1009
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
320 325 330

AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAG	1057
Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys	
335 340 345	
GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTG	1105
Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu	
350 355 360 365	
AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA TAT	1153
Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr	
370 375 380	
TAT GAT GAT CAT TAC TGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC	1201
Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu	
385 390 395	
ACA GTC TCC TCA GTC GAA GGT GGA AGT GGA GGT TCT GGT GGA AGT GGA	1249
Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly	
400 405 410	
GGT TCA GGT GGA GTC GAC GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCA ATC	1297
Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile	
415 420 425	
ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGA GCC AGT	1345
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser	
430 435 440 445	
TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC	1393
Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser	
450 455 460	
CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA GTG GCT TCT GGA GTC CCT	1441
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro	
465 470 475	

TAT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCA TAC TCT CTC ACA ATC 1489
 Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 480 485 490

AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAA CAG TGG 1537
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 495 500 505

AGT AGT AAC CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA 1585
 Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 510 515 520 525

CAT CAT CAC CAT CAT CAT TAGTCGAC 1611
 His His His His His His
 530

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 531 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

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

Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Ile Gln Leu Thr
 20 25 30

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
 35 40 45

Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu
 50 55 60

01.12.00

69

Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val
100 105 110

Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
145 150 155 160

Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
165 170 175

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln
180 185 190

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp
195 200 205

Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
210 215 220

Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala
225 230 235 240

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr
245 250 255

Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
260 265 270

01.12.00

70

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln
275 280 285

Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
290 295 300

Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys
305 310 315 320

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser
325 330 335

Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu
340 345 350

Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
355 360 365

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp
370 375 380

His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
385 390 395 400

Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
405 410 415

Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
420 425 430

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
435 440 445

Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
450 455 460

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe
465 470 475 480

01.12.00

71

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
485 490 495

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
500 505 510

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His
515 520 525

His His His
530

P A T E N T O V É N Á R O K Y
(upravené)

1. Jednořetězcový multifunkční polypeptid, který obsahuje
(a) první doménu obsahující vazebné místo imunoglobulinového řetězce nebo protilátky specificky rozpoznávající CD19 antigen, a
(b) druhou doménu obsahující vazebné místo imunoglobulinového řetězce nebo protilátky specificky rozpoznávající lidský CD3 antigen.
2. Polypeptid podle nároku 1, kde dvě domény jsou spojeny prostřednictvím polypeptidové spojky.
3. Polypeptid podle nároku 1 nebo 2, kde první a/nebo druhá doména napodobuje nebo odpovídá V_H a V_L oblasti přirozené protilátky.
4. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde protilátka je monoklonální protilátka, syntetická protilátka nebo humanizovaná protilátka.
5. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde alespoň jedna z domén je jednořetězcový fragment variabilní oblasti protilátky.
6. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde domény jsou uspořádány v pořadí V_L CD19- V_H CD19- V_H CD3- V_L CD3.
7. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 2 až 6, kde polypeptidová spojka obsahuje množství zbytků glycinu, alaninu a/nebo serinu.

8. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 2 až 7, kde polypeptidová spojka obsahuje množství po sobě následujících kopií aminokyselinové sekvence.
9. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 2 až 8, kde polypeptidová spojka obsahuje 1 až 5 aminokyselinových zbytků.
10. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 2 až 9, kde polypeptidová spojka obsahuje aminokyselinovou sekvenci Gly Gly Gly Gly Ser.
11. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, kde první doména obsahuje alespoň jednu CDR z V_H a V_L oblasti zahrnující aminokyselinovou sekvenci kódovanou DNA sekvencí zobrazenou na obrázku 8 od nukleotidu 82 do 414 (V_L) a nukleotidu 460 až 831 (V_H) a/nebo kde druhá doména obsahuje alespoň jednu CDR z V_H a V_L oblasti zahrnující aminokyselinovou sekvenci kódovanou DNA sekvencí zobrazenou na obrázku 8 od nukleotidu 847 do 1203 (V_H) a nukleotidu 1258 až 1575 (V_L).
12. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, kde
- (a) vazebné místo první domény má afinitu přinejmenším $10^{-7}M$, a/nebo
 - (b) vazebné místo druhé domény má afinitu menší než $10^{-7}M$.
13. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, který je bispecifická jednořetězcová protilátka.
14. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, který obsahuje alespoň jednu další doménu.

15. Polypeptid podle nároku 14, kde další doména je připojená prostřednictvím kovalentní nebo nekovalentní vazby.
16. Polypeptid podle nároku 14 nebo 15, kde alespoň jedna další doména obsahuje efektorovou molekulu mající konformaci vhodnou pro biologickou aktivitu, schopnou sekvestrace iontu nebo selektivní vazby na pevný podklad nebo k předem vybrané determinantě.
17. Polynukleotid, který při expresi kóduje polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16.
18. Vektor obsahující polynukleotid podle nároku 17.
19. Buňka transfekovaná polynukleotidem podle nároku 17 nebo vektorem podle nároku 18.
20. Způsob přípravy polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci buňky podle nároku 19 a izolaci polypeptidu z tkáňové kultury.
21. Přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, polynukleotid podle nároku 17 nebo vektor podle nároku 18.
22. Přípravek podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je farmaceutický přípravek volitelně dále obsahující farmaceuticky přijatelný nosič.
23. Přípravek podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je diagnostický přípravek volitelně dále obsahující prostředky vhodné pro detekci.

24. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, polynukleotidu podle nároku 17 nebo vektoru podle nároku 18 pro výrobu farmaceutického přípravku pro léčení malignit B lymfocytů, autoimunitních chorob se vztahem k B lymfocytům nebo deplece B lymfocytů.

25. Použití podle nároku 24, kde malignita B lymfocytů je ne Hodgkinský lymfom.

26. Použití polynukleotidu podle nároku 17 nebo vektoru podle nároku 18 pro výrobu přípravků pro genovou terapii.

27. Způsob pro identifikaci aktivátorů nebo inhibitorů aktivace nebo stimulace T lymfocytů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

(a) pěstování T lymfocytů a CD19 pozitivních buněk, výhodně B lymfocytů, v přítomnosti polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 a volitelně v přítomnosti složky schopné poskytnout detekovatelný signál jako odpověď na aktivaci T lymfocytů testovanou sloučeninou v podmínkách umožňujících aktivaci T lymfocytů, a

(b) detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti signálu vzniklého interakcí sloučeniny s buňkami.

28. Způsob výroby farmaceutického přípravku v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky způsobu podle nároku 27 a formulaci sloučenin podle kroku (b) do farmaceuticky přijatelné lékové formy.

29. Způsob podle nároku 28 nebo 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina podle kroku (b) je modifikovaná pomocí peptidomimetik.

30. Způsob léčení malignit B lymfocytů, autoimunitních chorob se vztahem k B lymfocytům nebo deplece B lymfocytů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje zavedení polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, polynukleotidu podle nároku 17 nebo vektoru podle nároku 18 do lidského jedince postiženého uvedenou malignitou nebo nemocí.

31. Způsob pro oddálení patologického stavu, který je způsoben chorobou B lymfocytů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje zavedení polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, polynukleotidu podle nároku 17 nebo vektoru podle nároku 18 do lidského jedince postiženého uvedeným patologickým stavem.

Zastupuje:

Dr. Miloš Všetečka

01.12.00

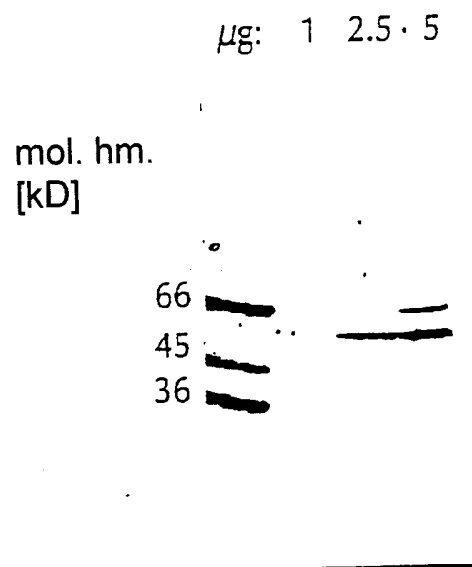
7V2070 - 3889

~~85182~~

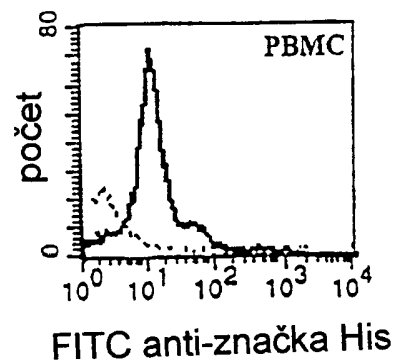
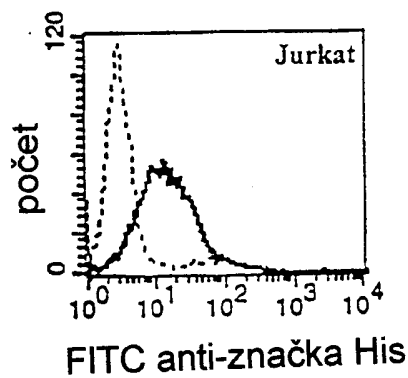
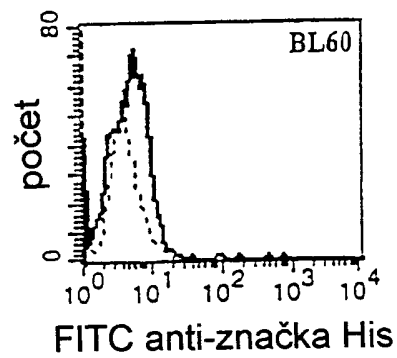
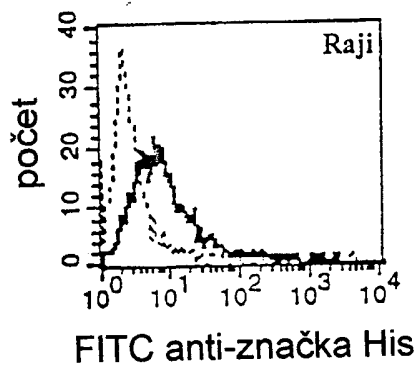
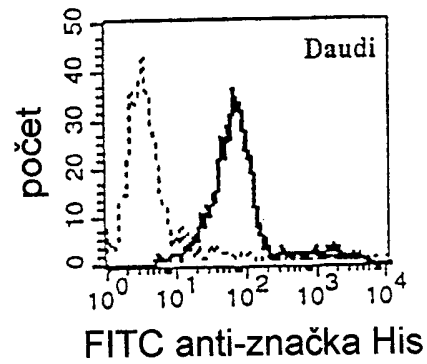
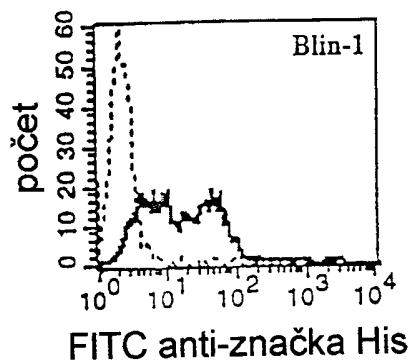
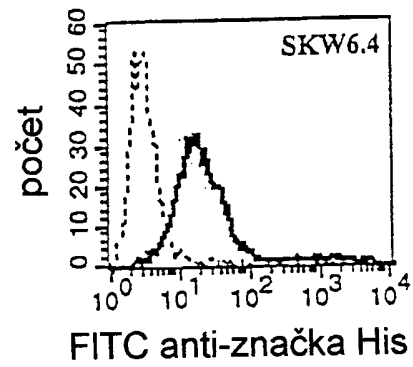
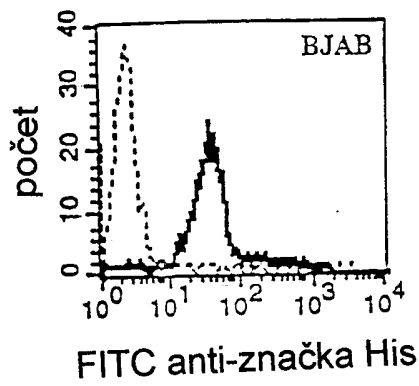
1/23

Obrázek 1

Purifikovaná bscCD19xCD3 na SDS/polyakrylamidovém gelu obarvená
Coomasie modří

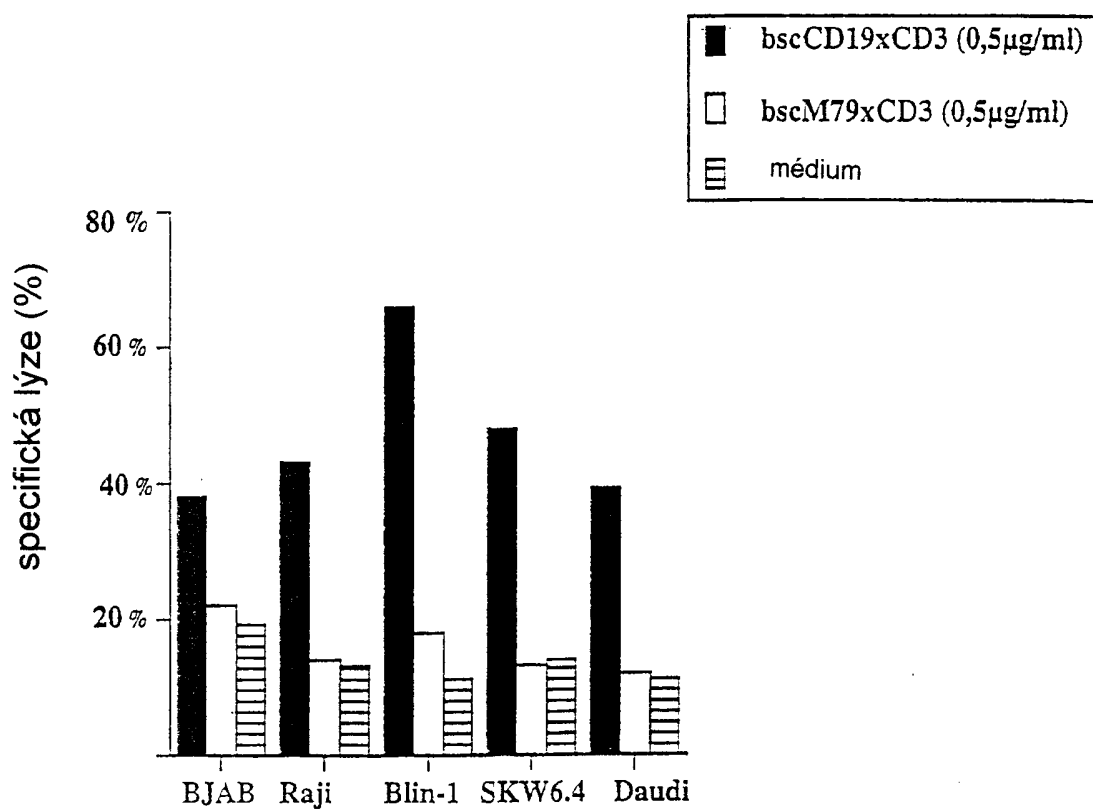


Obrázek 2



Obrázek 3

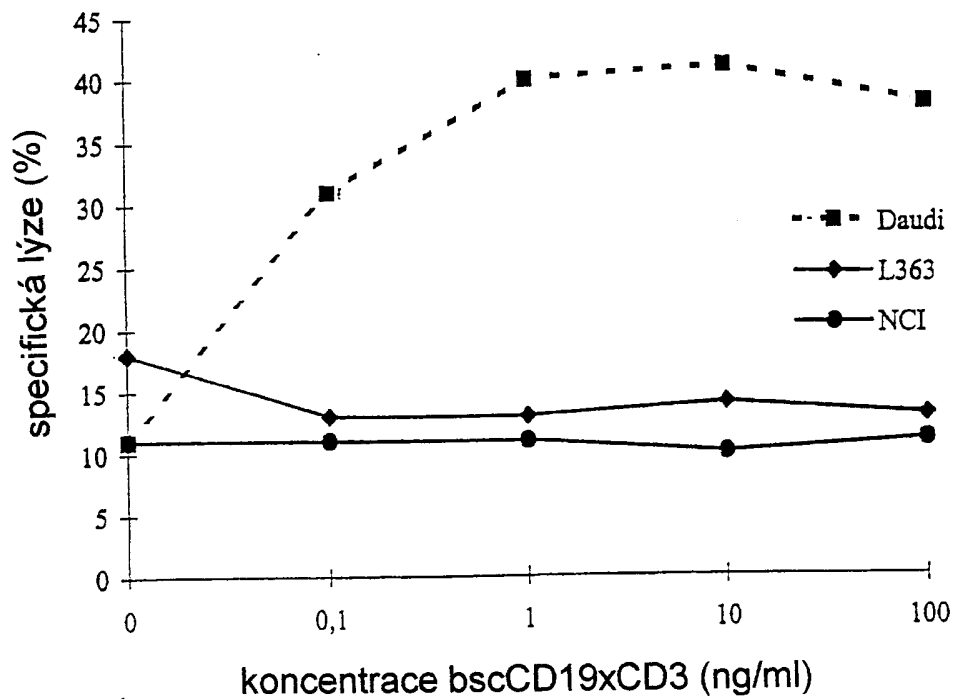
Cytotoxicita bscCD19xCD3 v testu uvolňování ^{51}Cr
s nestimulovanými PBMC proti různým liniím B lymfocytů



Obrázek 4

4/23

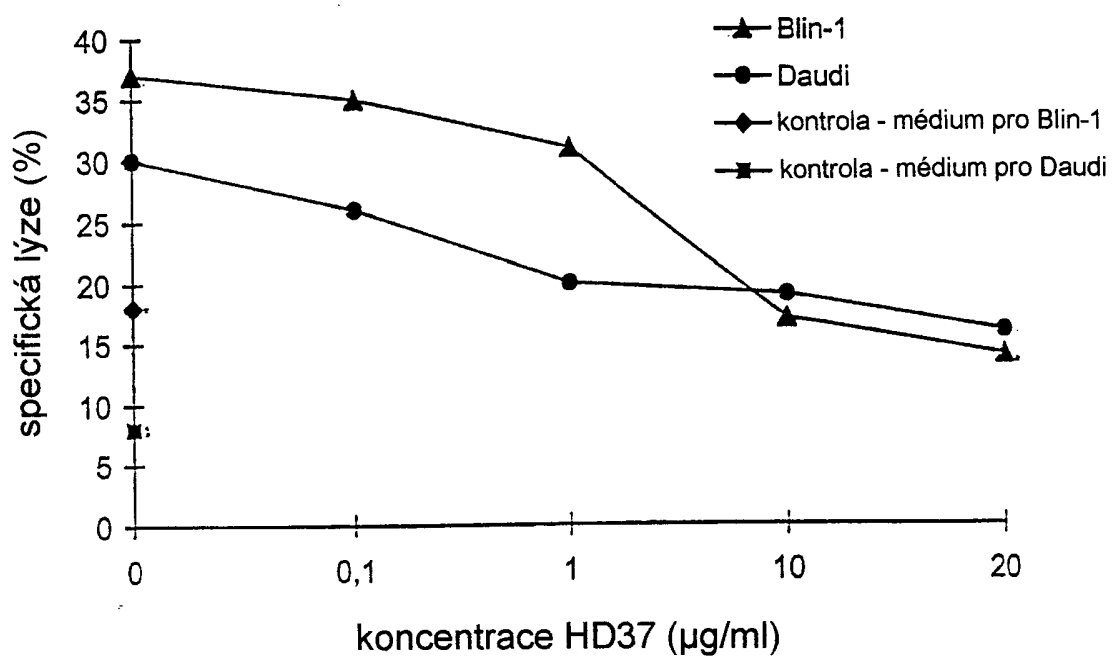
Test cytotoxicity s PBMC proti plazmocytomovým buňkám
CD19⁺ Daudi a CD19⁻ (L363 a NCI)



Obrázek 5

5/23

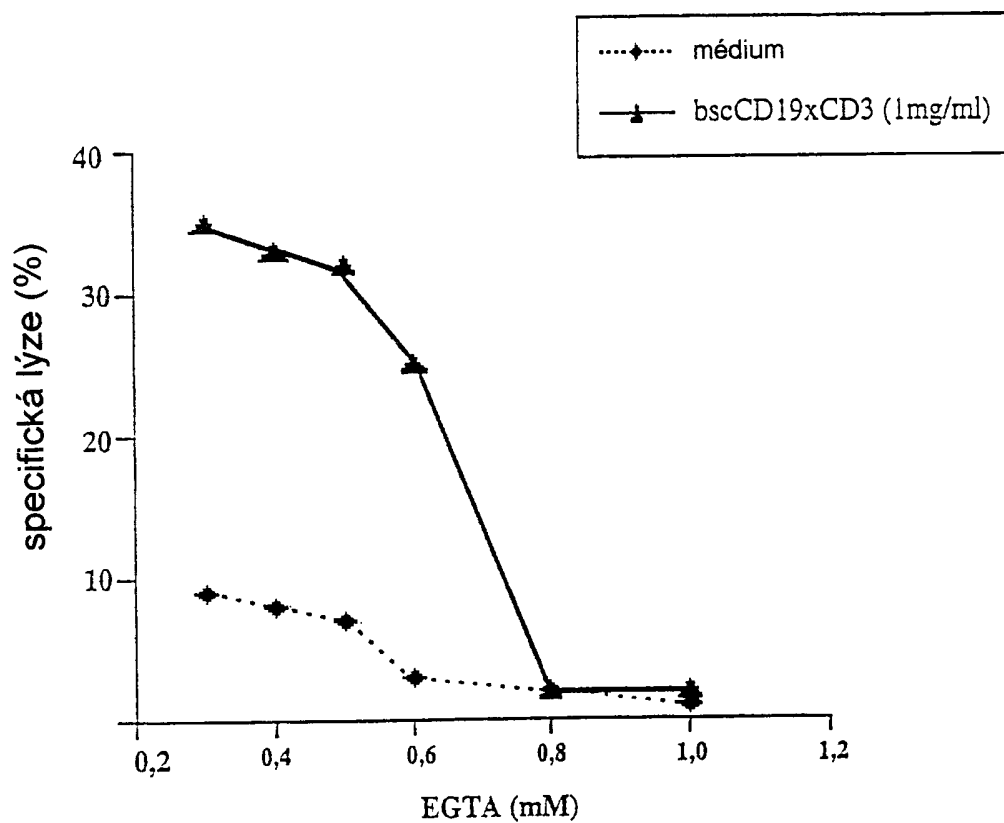
Inhibice cytotoxicity bscCD19xCD3 základní anti-CD19
protilátkou HD37



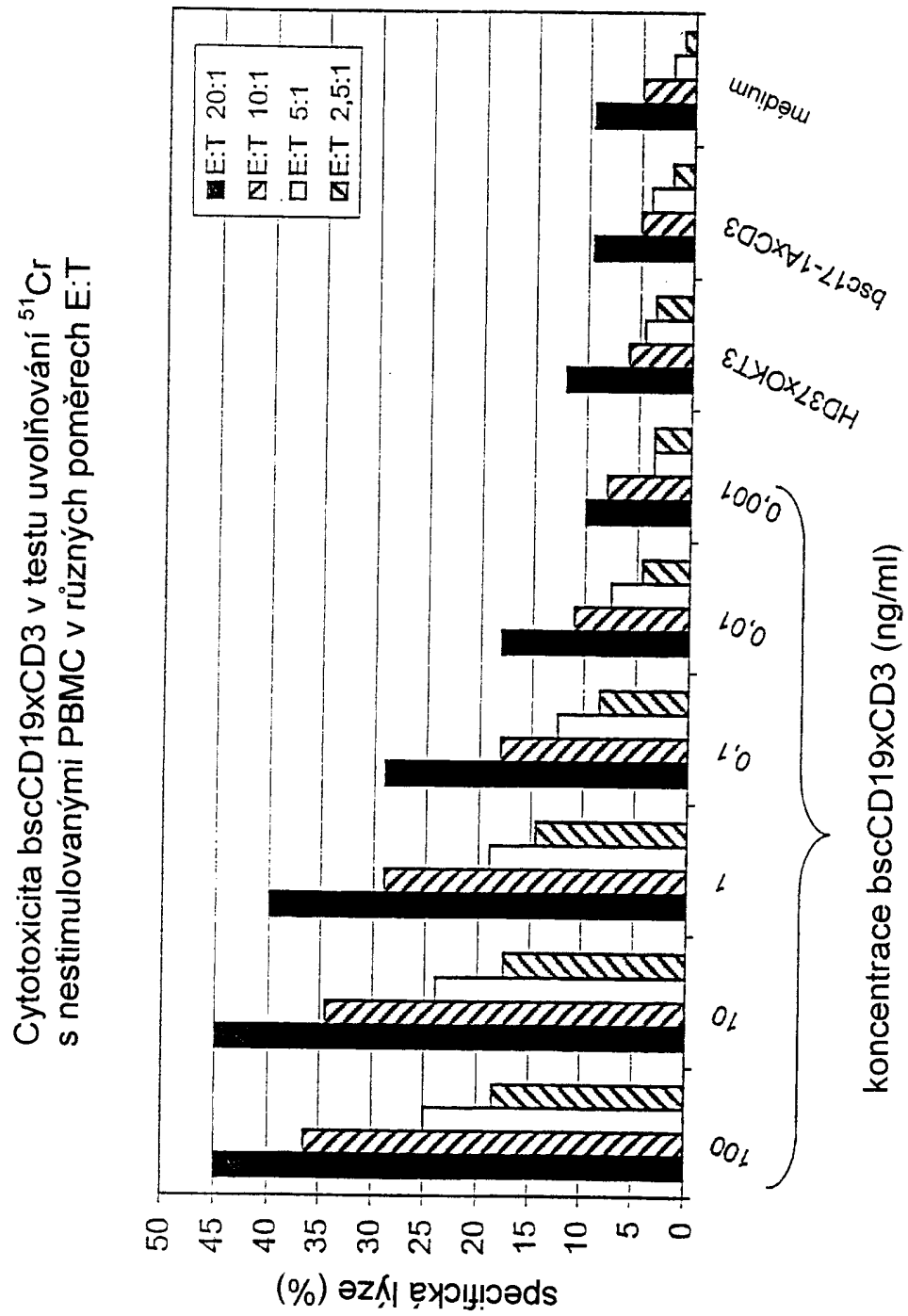
6/23

Obrázek 6

Test cytotoxicity s nestimulovanými PBMC proti buňkám Daudi po přidávání zvyšujícího se množství EGTA



Obrázek 7



01.12.00

8/23

Obrázek 8

-10 -5 -1
5' G AAT TCC ACC

ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA	GGT	GTC	CAC
M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A	T	A	T	G	V	H
TCC	GAC	TAC	AAA	GAT	GAT	GAC	GAT	AAG	GAT	ATC	CAG	CTG	ACC	CAG	TCT	CCA	GCT
S	D	Y	K	D	D	D	D	K	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A
TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	GCC	ACC	ATC	TCC	TGC	AAG	GCC	AGC	CAA
S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q
AGT	GTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	AGT	TAT	TTG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	ATT	CCA	GGA
S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	L	N	W	Y	Q	Q	I	P	G
CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	TCC	AAT	CTA	GTT	TCT	GGG	ATC	CCA
Q	P	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	N	L	V	S	G	I	P
CCC	AGG	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT
P	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P
GTG	GAG	AAG	GTG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	CAC	TGT	CAG	CAA	AGT	ACT	GAG	GAT	CCG
V	E	K	V	D	A	A	T	Y	H	C	Q	Q	S	T	E	D	P
TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGG	ACC	AAG	CTC	GAG	ATC	AAA	GGT	GGT	GGT	GCT	TCT	GGC
W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	G	G	G	G	S	G
GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT
G	G	G	S	G	G	G	G	S	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A
GAG	CTG	GTG	AGG	CCT	GGG	TCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAT
E	L	V	R	P	G	S	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y
GCA	TTC	AGT	AGC	TAC	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GGT	CTT
A	F	S	S	Y	W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L
GAG	TGG	ATT	GGA	CAG	ATT	TGG	CCT	GGA	GAT	GGT	GAT	ACT	AAC	TAC	AAT	GGA	AAG
E	W	I	G	Q	I	W	P	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K
TTC	AAG	GGT	AAA	GCC	ACT	CTG	ACT	GCA	GAC	GAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG
F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	E	S	S	S	T	A	Y	M
CAA	CTC	AGC	AGC	CTA	GCA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	CGG
Q	L	S	S	L	A	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	R

01.12.00

Obrázek 8

(pokračování)

9/23

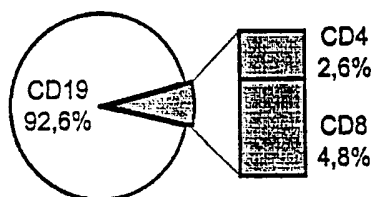
765	774	783	792	801	810
GAG ACT ACG ACG GTA GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG					
E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G					
819	828	837	846	855	864
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCC GGA GGT GGT GGA TCC GAT ATC AAA CTG CAG CAG					
T T V T V S S G G G G S D I K L Q Q					
873	882	891	900	909	918
TCA GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG ACT					
S G A E L A R P G A S V K M S C K T					
927	936	945	954	963	972
TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA					
S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G					
981	990	999	1008	1017	1026
CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC					
Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA					
N Q K F K D K A T L T T D K S S S T					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT					
A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GCA AGA TAT TAT GAT GAT CAT TAC TGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT					
A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
CTC ACA GTC TCC TCA GTC GAA GGT GGA AGT GGA GGT TCT GGT GGA AGT GGA GGT					
L T V S S V E G G S G G S G G S G G					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
TCA GGT GGA GTC GAC GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA					
S G G V D D I Q L T Q S P A I M S A					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGA GCC AGT TCA AGT GTA AGT TAC					
S P G E K V T M T C R A S S S V S Y					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
ATG AAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC					
M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
ACA TCC AAA GTG GCT TCT GGA GTC CCT TAT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG					
T S K V A S G V P Y R F S G S G S G					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
ACC TCA TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT					
T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
TAC TGC CAA CAG TGG AGT AGT AAC CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG					
Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L					
1575	1584	1593			
GAG CTG AAA CAT CAT CAC CAT CAT CAT TAG TCG AC 3'					
E L K H H H H H H *					

Obrázek 9

A

10/23

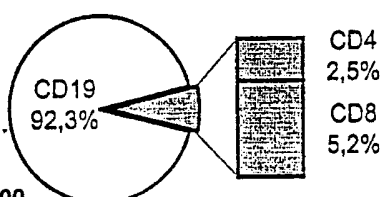
čas = 0
počet = 3 000 000



B

17-1A $\times$ CD3
0,5 μ g/ml + IL-2

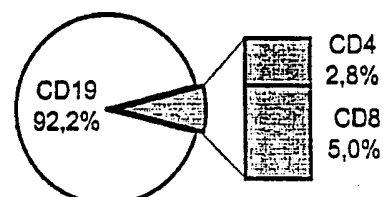
čas = 5 dnů
počet = 2 300 000



C

Médium + IL-2

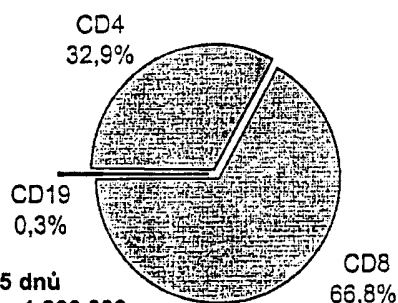
čas = 5 dnů
počet = 3 200 000



D

CD19 $\times$ CD3
0,5 μ g/ml + IL-2

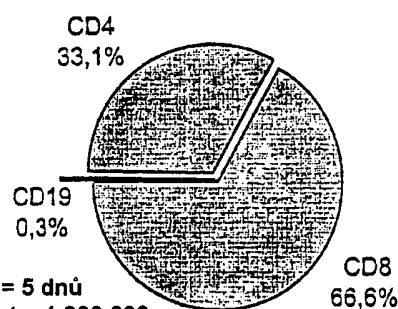
čas = 5 dnů
počet = 1 800 000



E

CD19 $\times$ CD3
0,5 μ g/ml w/o IL-2

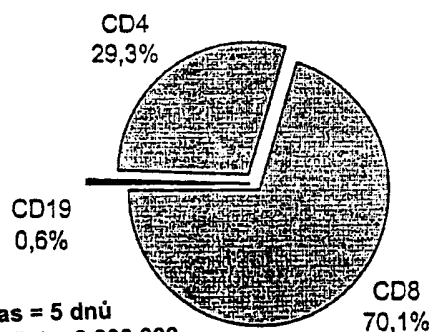
čas = 5 dnů
počet = 1 900 000



F

CD19 $\times$ CD3
0,05 μ g/ml + IL-2

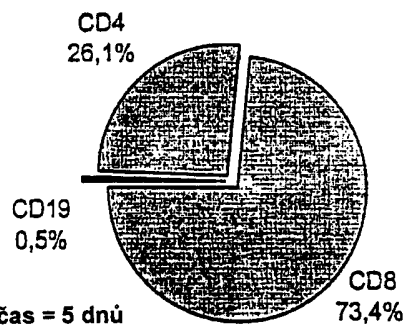
čas = 5 dnů
počet = 2 300 000



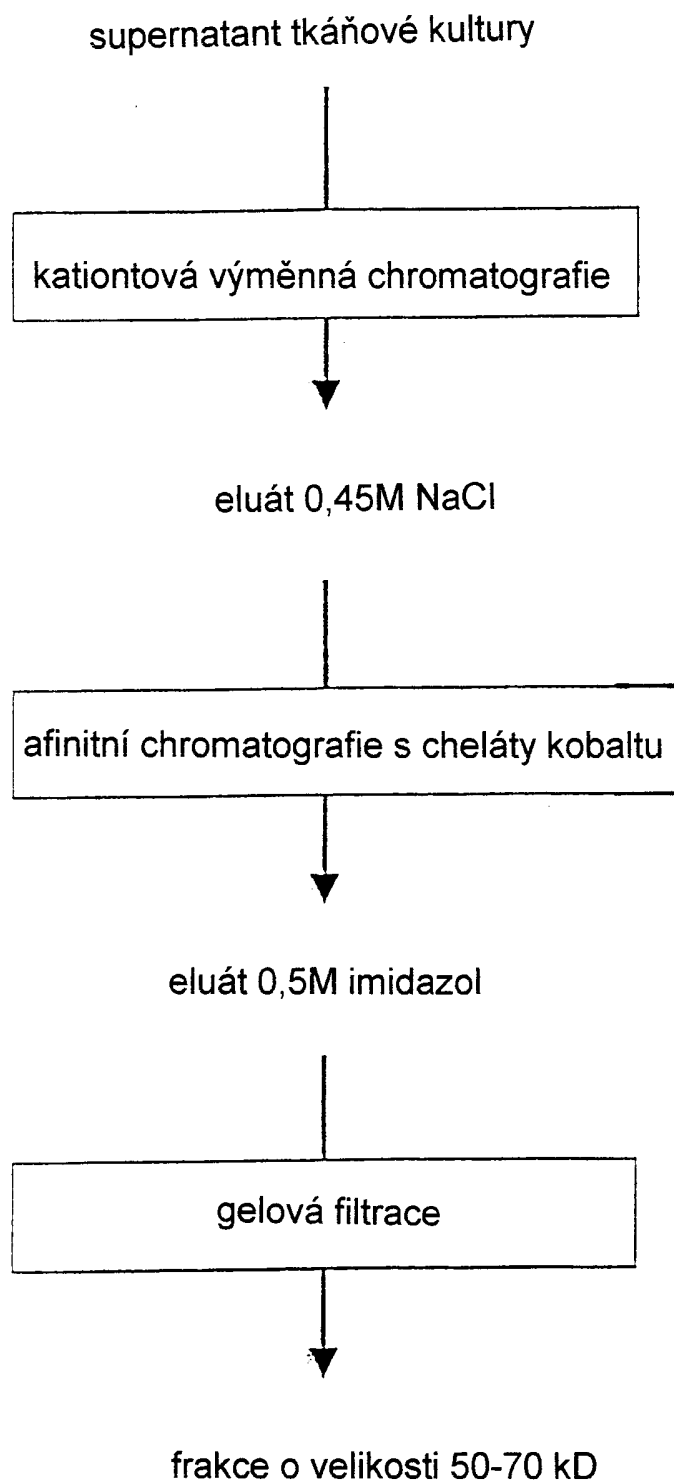
G

CD19 $\times$ CD3
0,05 μ g/ml w/o IL-2

čas = 5 dnů
počet = 910 000

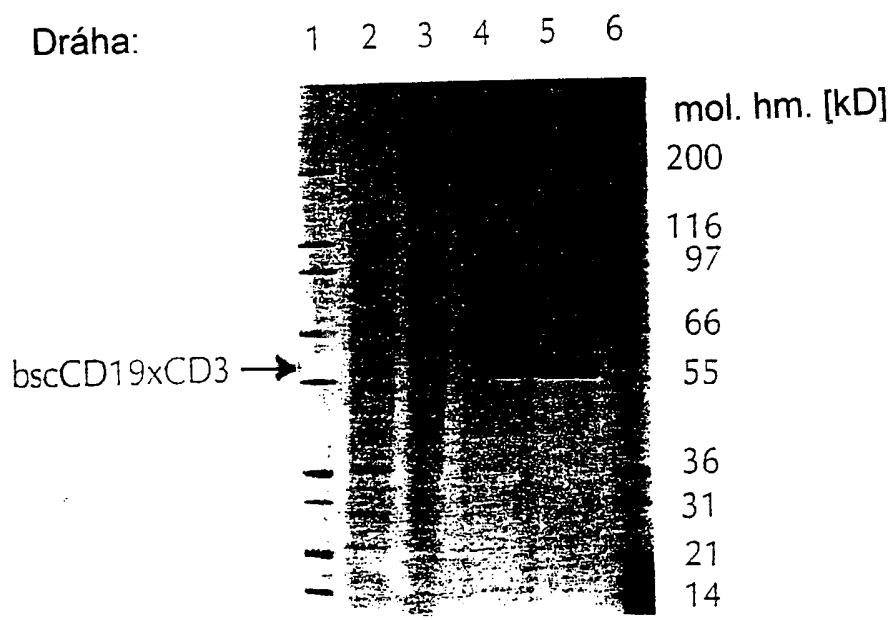


11/23

Obrázek 10 Purifikace bscCD19xCD3

Obrázek 11

Analýza bscCD19xCD3 pomocí SDS-PAGE

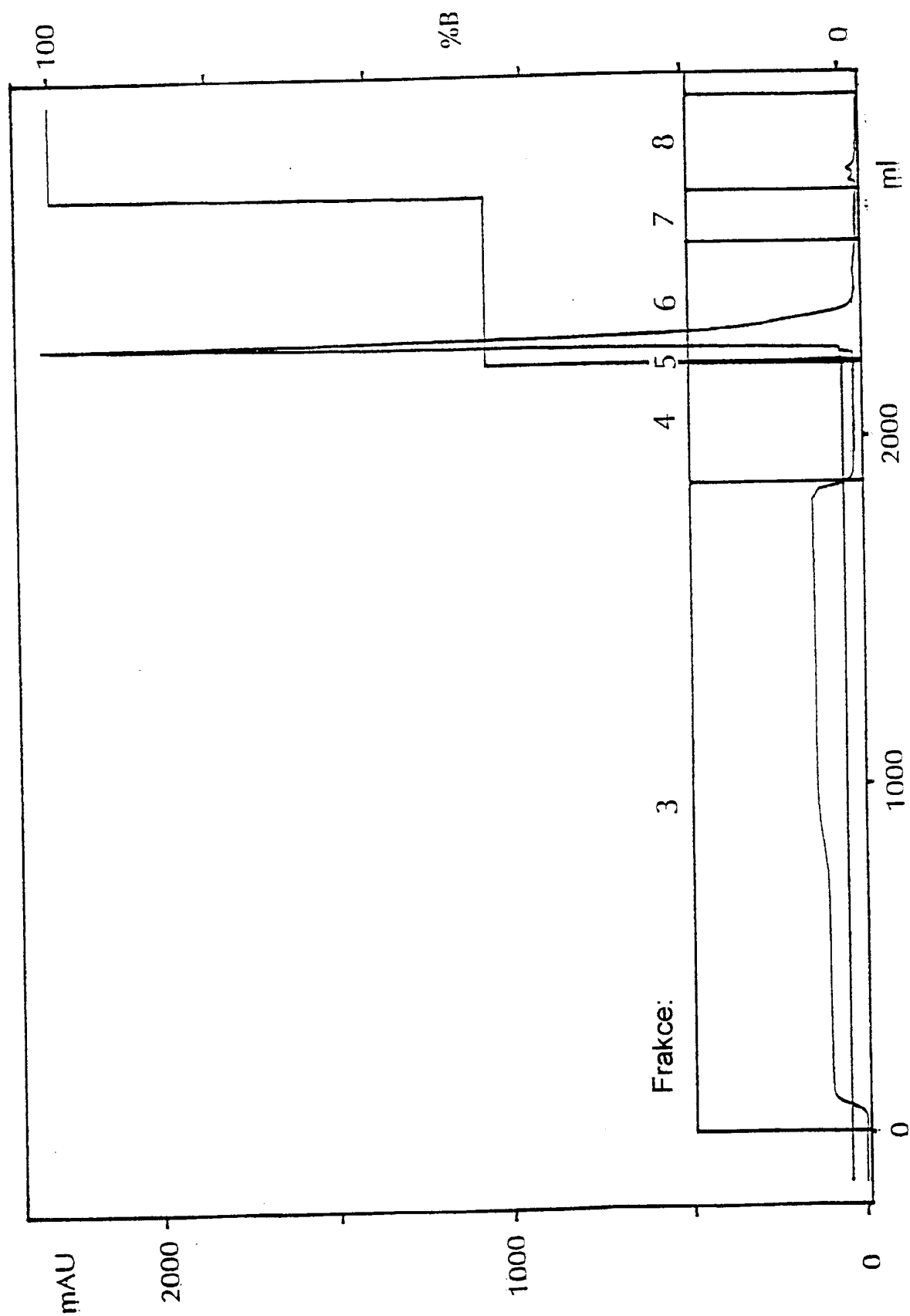


01.12.00

13/23

Obrázek 12

Kationtová výměnná chromatografie bscCD19xCD3

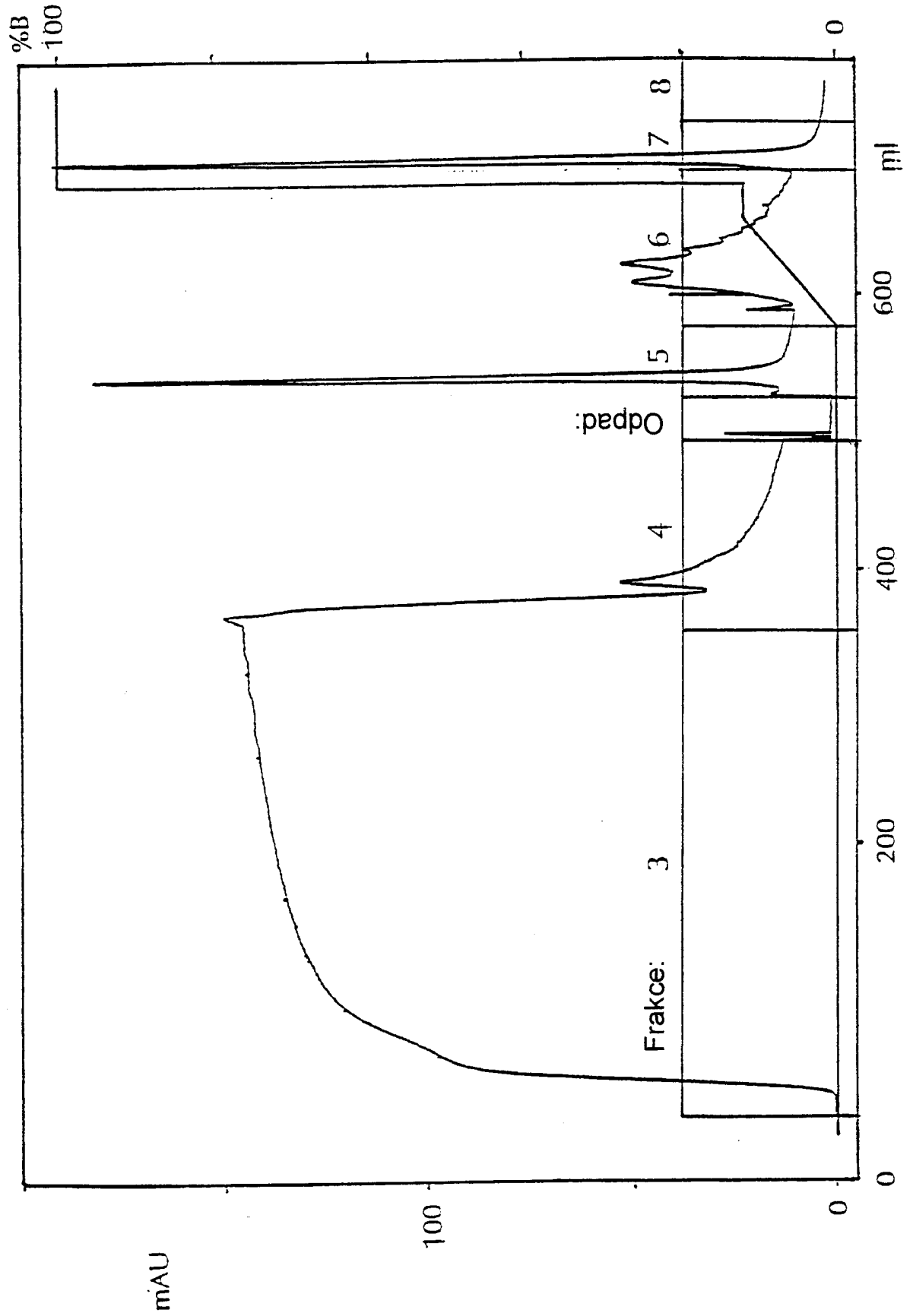


01.12.00

14/23

Obrázek 13

Afinitní chromatografie s cheláty kobaltu bscCD19xCD3

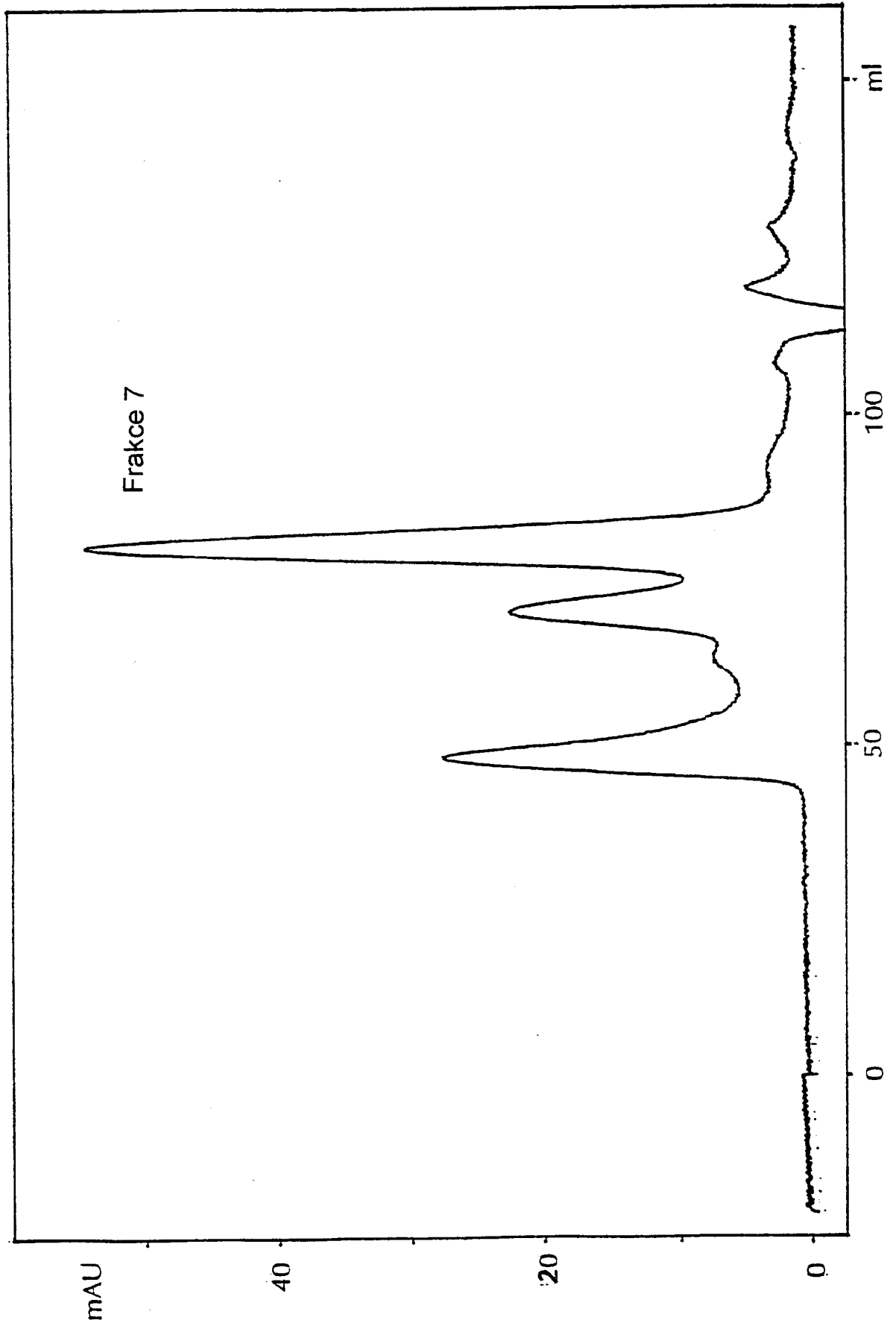


01.12.00

15/23

Obrázek 14

Gelová filtrace bscCD19xCD3

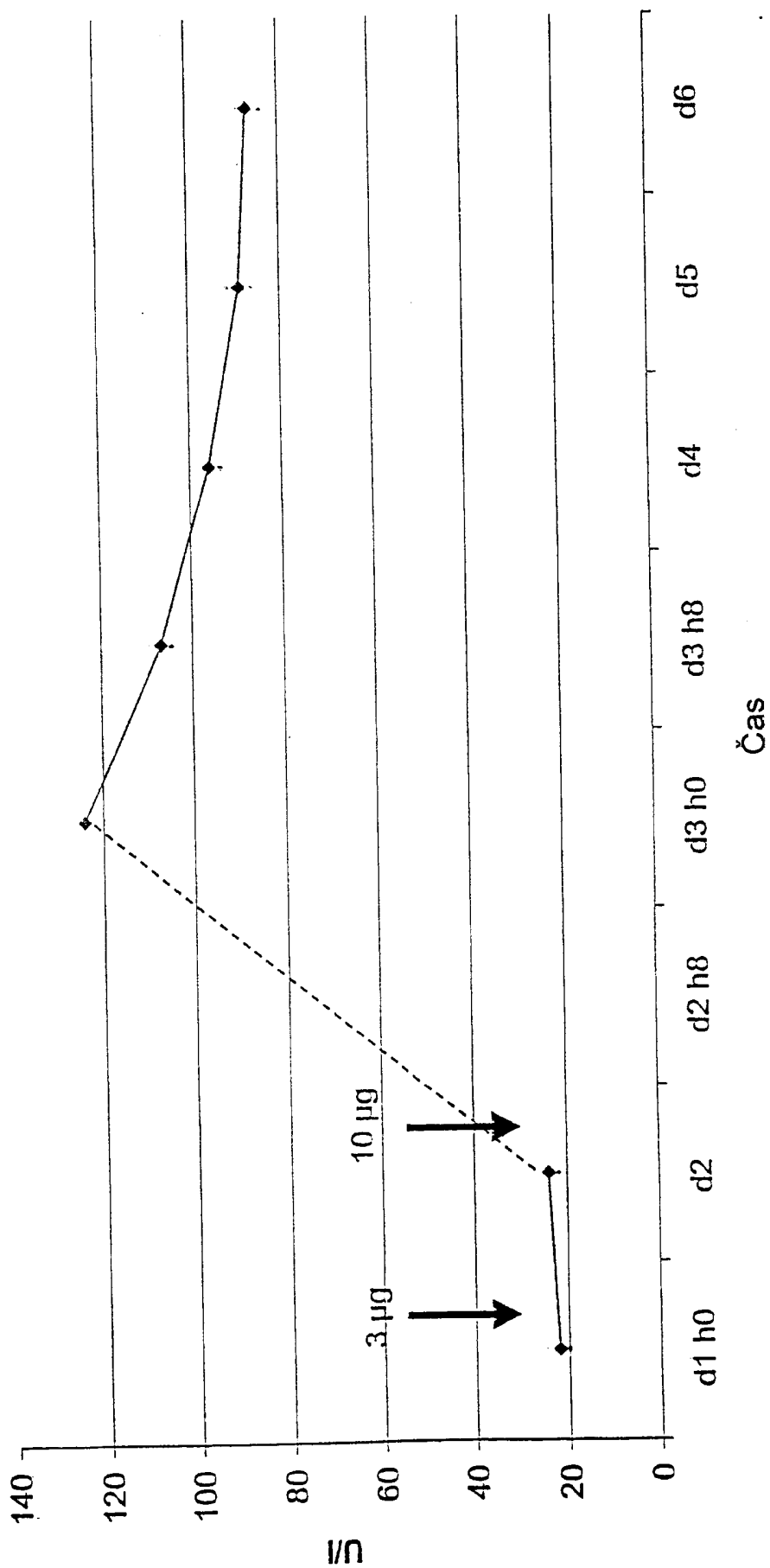


01.12.00

Obrázek 15

16/23

GGT

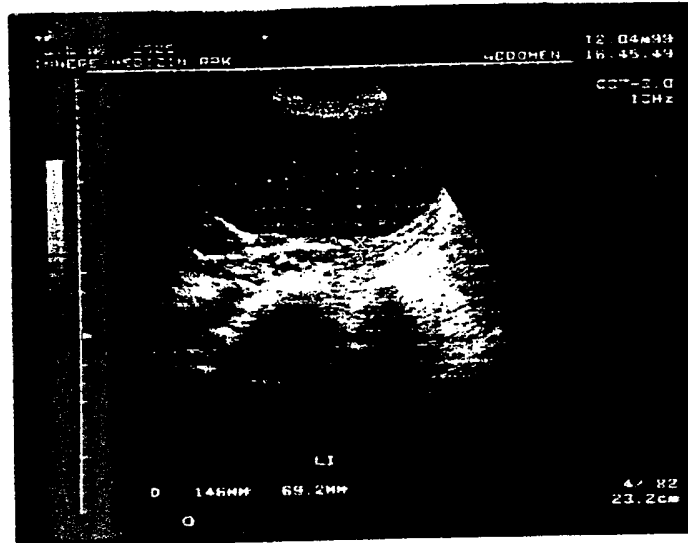


01.12.00

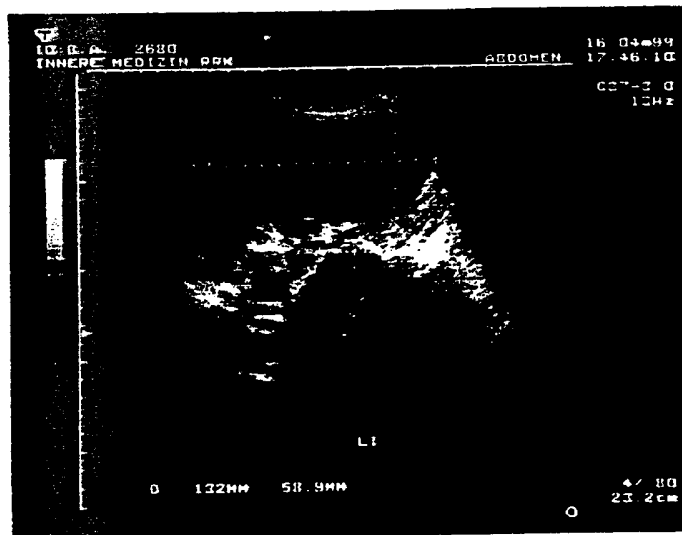
17/23

Obrázek 16

A

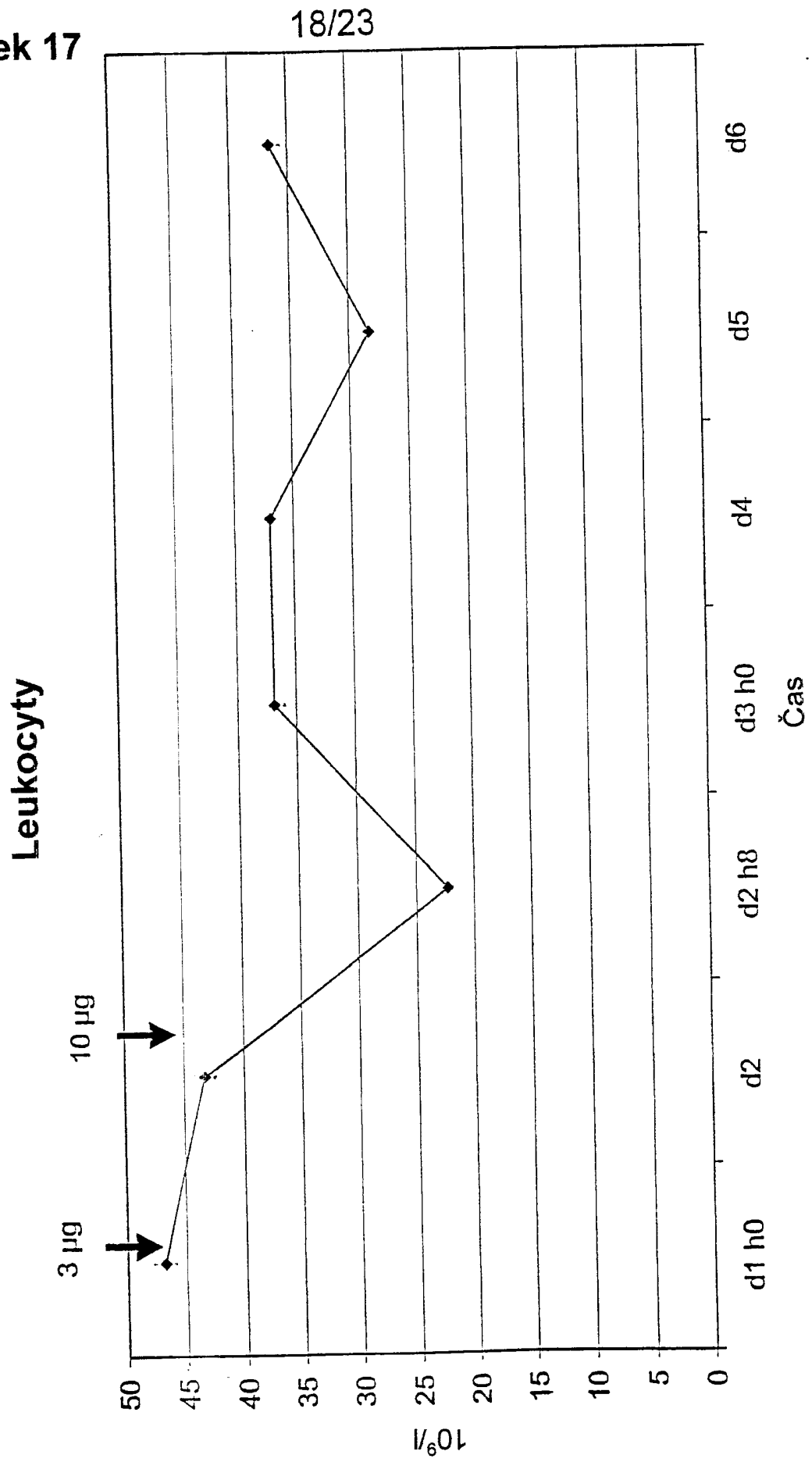


B



01.12.00

Obrázek 17

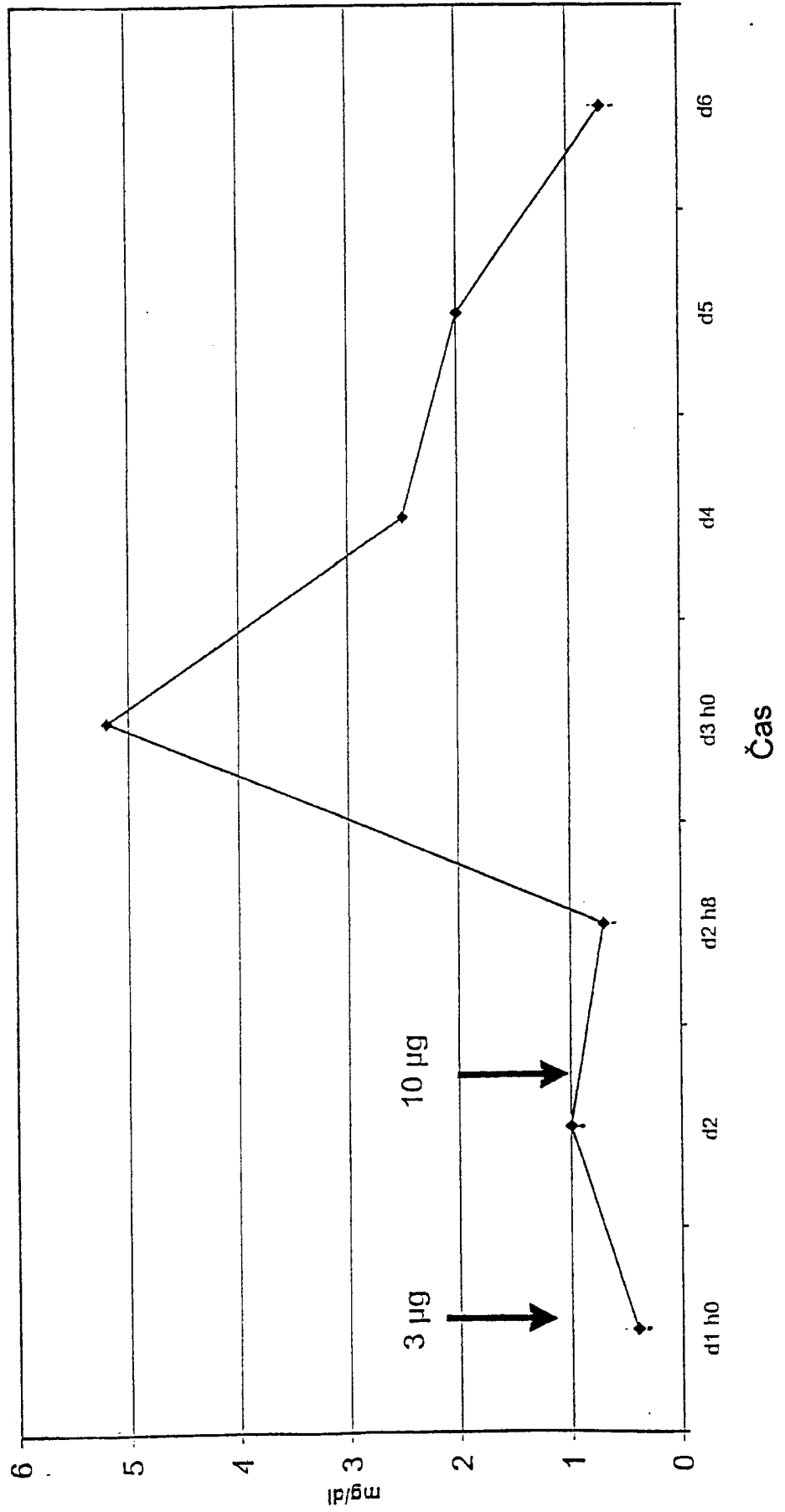


01.12.00

Obrázek 18

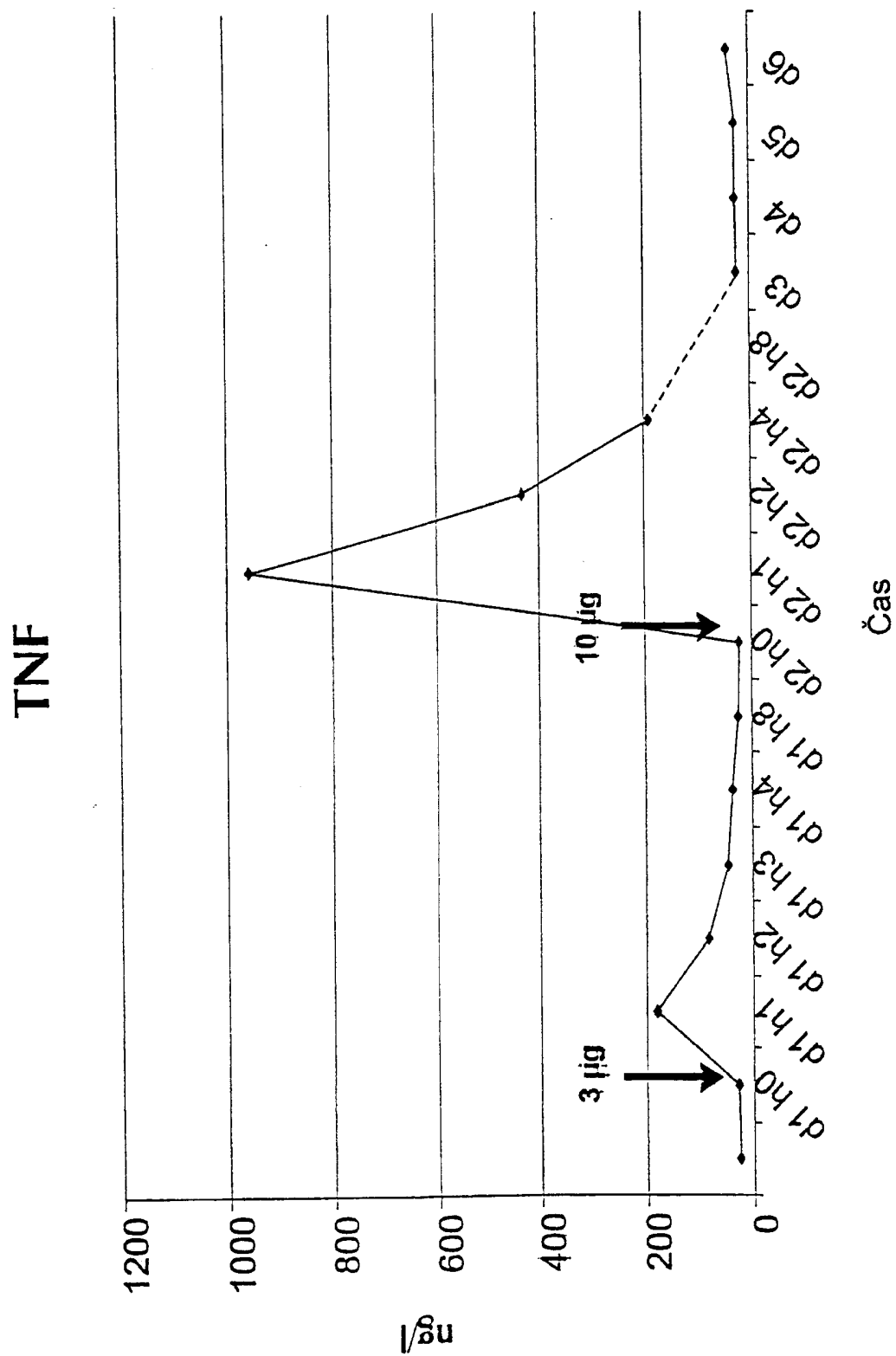
19/23

CRP



Obrázek 19

20/23

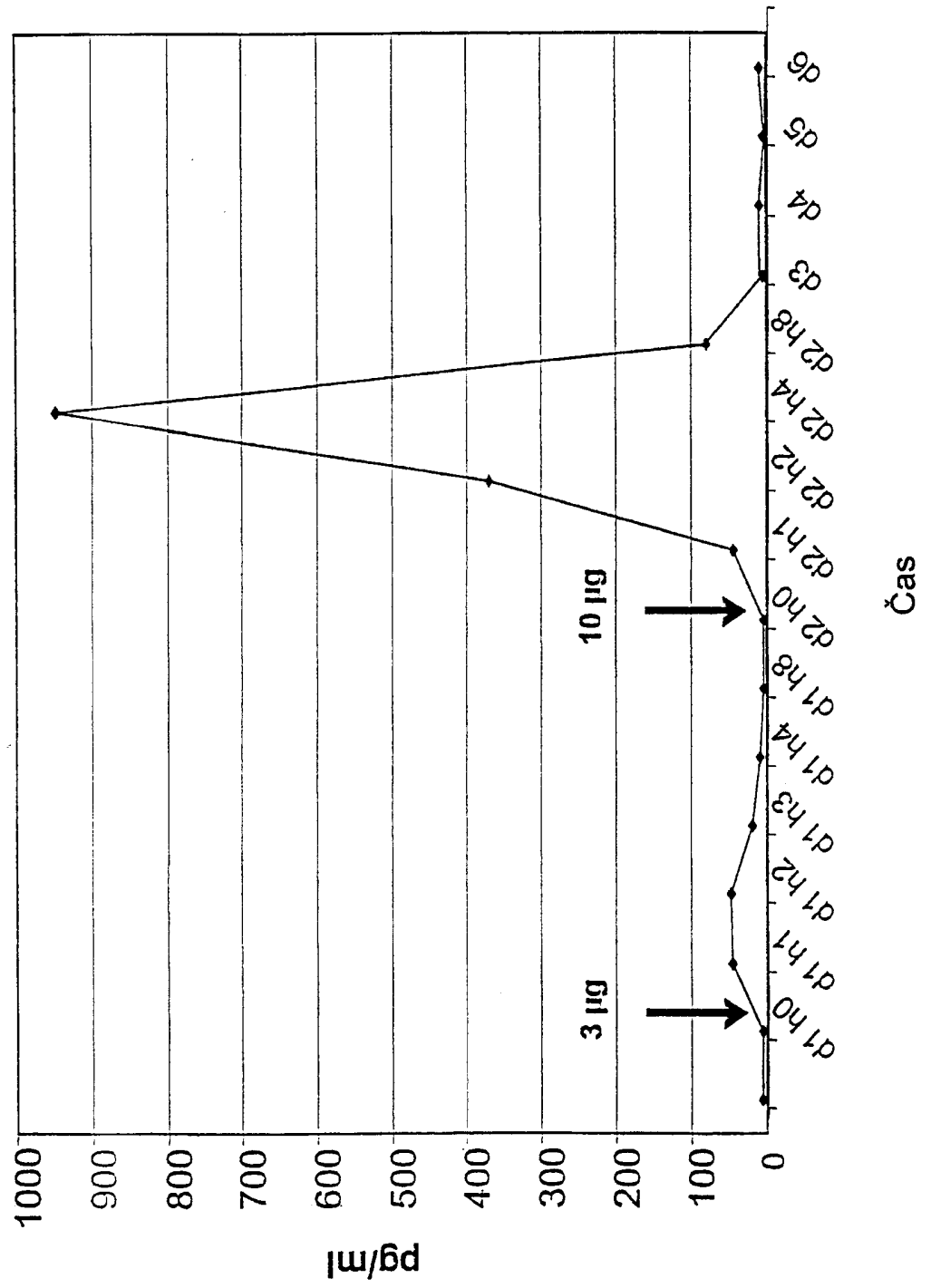


01.12.00

Obrázek 20

21/23

IL-6

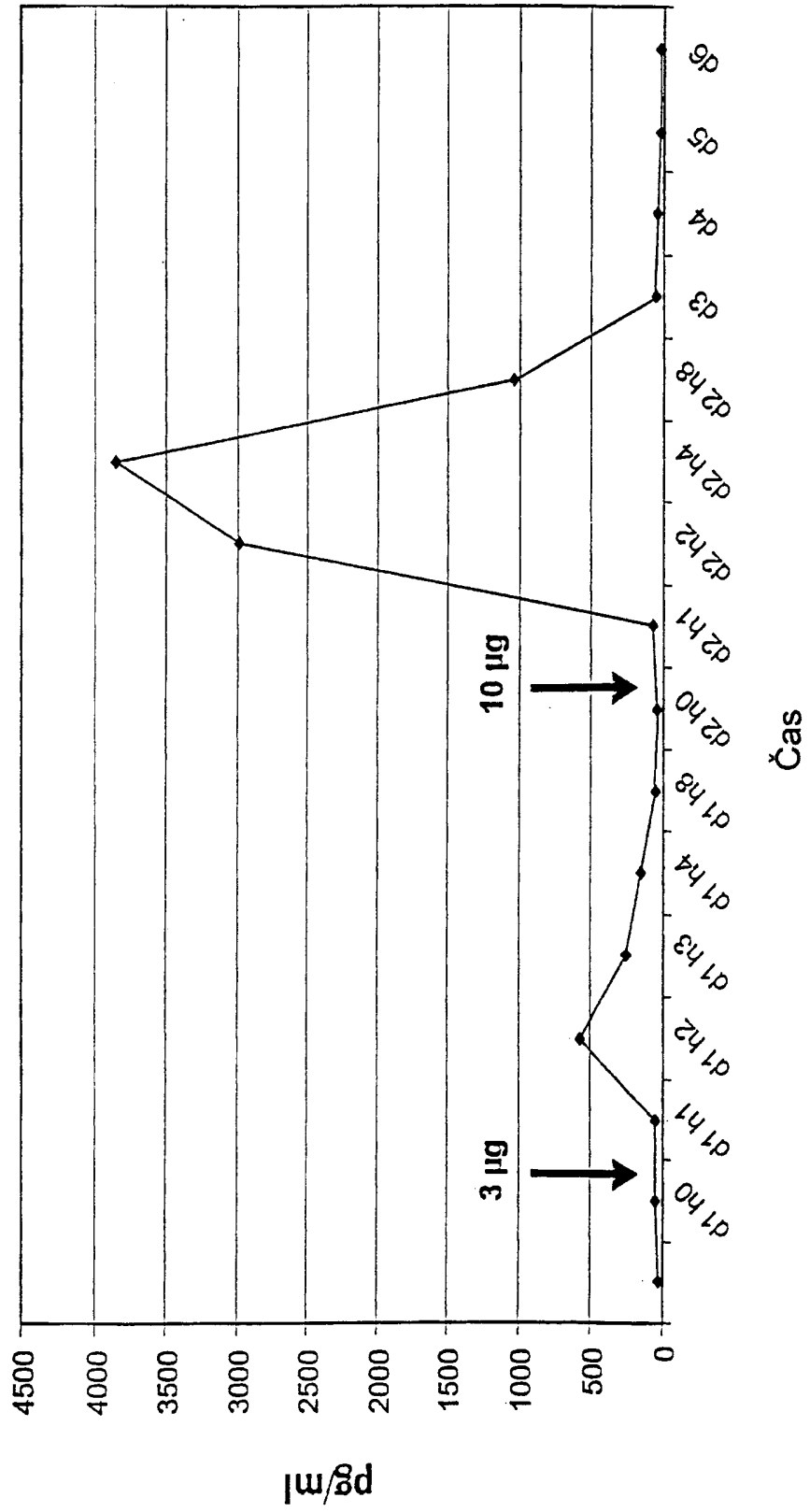


01.12.00

22/23

Obrázek 21

IL-8



01.12.00

Obrázek 22

23/23

IL-2 R

