

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/180143**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/JP99/03433**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/00219**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4753

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 45/00

A 61 K 39/395

A 61 P 35/00

//(C 12 P 21/08, C 07 K 16/18, C 07 K 16/28,
C 07 K 16/46, C 12 N 15/62)

(71) Přihlašovatel:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, Tokyo,
JP;

(72) Původce:

Sato Koh, Gotenba-shi, JP;
Tsunenari Toshiaki, Gotenba-shi, JP;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou
krizi

(57) Anotace:

Řešení je terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi,
které jako aktivní složku obsahuje látku, schopnou inhibovat
vazbu mezi proteinem příbuzným parathyroidnímu hormonu
(PTHrP) a jeho receptorem.

TERAPEUTICKÉ ČINIDLO NA HYPERKALCINEMICKOU KRIZI

PV 2000-4753

17/321

Oblast techniky

Předmětný vynález se vztahuje k terapeutickému činidlu na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem, které obsahuje jako aktivní přísadu látku, schopnou inhibovat vazbu proteinu příbuzného parathyroidnímu hormonu (PTHrP) na svůj receptor.

Dosavadní stav techniky

Hyperkalcinémie související s maligním nádorem je vážná komplikace, která se vyskytuje u 5 až 20 % z celkového počtu pacientů s maligním nádorem a pokud zůstává neléčena, je téměř jistě smrtelná. Z tohoto důvodu byla hyperkalcinémie považována za konečný symptom maligního nádoru. Regulace hyperkalcinémie značně ovlivňuje terapeutické prognózy a QOL (Quality of Live, kvalitu života) pacienta a z klinického hlediska tedy hraje důležitou roli.

Obecně lze hyperkalcinémii zjištěnou u pacientů s maligním nádorem rozdělit na dva typy: humorální hyperkalcinémii zhoubného bujení (HHM), která je způsobena nádorem produkovaným humorálním faktorem, který se vyskytuje v kostech a lokální osteolytickou hyperkalcinémii (LOH), která je způsobena topikální činností tumoru, který metastázuje nebo se infiltruje do kostí. V případě HHM se předpokládá, že vylučování vápníku je v důsledku zrychlení kostní resorpce nebo destrukce zvýšeno a výsledkem je vznik hyperkalcinémie doprovázené poklesem renální exkreční kapacity vápníku (viz Seiki Wada a Naokazu Nagata, Naika 69, 644 až 648).

Za hyperkalcinémii je považován stav, kdy hladina vápníku v séru přesáhne 12 mg/dl a který u pacientů s maligním nádorem v jeho raném stadiu nespecificky vyvolává špatné pocity při pohledu nebo pomýšlení na jídlo, nevolnost a zvracení. Jestliže dojde ke zhoršení hyperkalcinémie, může se vzhledem ke snížené schopnosti koncentrovat tekutiny, což je způsobeno onemocněním distálního renálního tubulu, vyskytnout polyurie a dehydratace, která může souviset s nedostatečným příjmem vody v důsledku nevolnosti nebo zvracení. Také se může vyskytnout kalcifikace ledvin, kůže, krevních cév, plic, srdce a žaludku. Jestliže dojde ještě k dalšímu zhoršení hyperkalcinémie, vyskytne se zhoršené vědomí jako je např. obecná netečnost a zmatení, což může eventuálně vést až ke kómatu a zástavě srdce (viz Harrison's Text for Internal Medicine, 3427, Internal Medicine, 1081 až 1084, Asakura Shoten).

Jako humorální faktor, který způsobuje HHM (jeden typ hyperkalcinémie související se zhoubným bujením), objevil Moseley J. M. a kol. (Proc Natl. Acad. Sci. USA. (1987) 84, 5048

až 5052) peptid příbuzný parathyroidnímu hormonu (dále pro zjednodušení uváděn jako „PTHrP“), což je látka podobná parathyroidnímu hormonu (PTH).

Poté byl izolován gen kódující PTHrP (Suva, L. J. *a kol.*, Science (1987) 237, 893). Analýza genu prozradila, že existují tři typy lidského PTHrP, které v závislosti na způsobu selektivního sestřihu genu obsahují 139, 141 a 173 aminokyselinových zbytků a že v krvi jsou přítomny různé fragmenty, produkované limitovaným štěpením celého PTHrP (1 až 139) (Baba, H., Clinical Calcium (1995) 5, 229 až 223). U PTHrP se předpokládá, že 8 aminokyselin vně 13 N-koncových aminokyselin 1 až 13 je identických s aminokyselinami PTH, že sekvence obsahující aminokyseliny 14 až 34 má trojrozměrnou strukturu podobnou struktuře PTH a že se N-koncová oblast PTHrP může vázat na PTH/PTHrP receptory, které jsou sdíleny PTH (Jueppner, H. *a kol.*, Science (1991), 254, 1024 až 1026; Abou-Samra, A-B, *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 2732 až 2736).

PTH/PTHrP receptory jsou přítomny zejména v kostech a ledvinách (Chohei Sigeno, Clinical Calcium (1995) 5, 355 až 359) a je známo, že řada intracelulárních signálních transdukčních systémů může být aktivována prostřednictvím vazby PTHrP na své receptory. Jedním z intracelulárních signálních transdukčních systémů je adenylcykláza a další je fosfolipáza C. Adenylcykláza, je-li aktivována, způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace cAMP, čímž dojde k indukci aktivace proteinkinázy A. Fosfolipáza C štěpí fosfatidylinositol 4,5-bisfosfonát za vzniku inositol 1,4,5-trifosfonátu a diacylglycerolu. Těchto signálních transdukčních systémů se zúčastňuje G protein (Coleman, D. T. *a kol.*, Biochemical mechanisms of parathyroid hormone action. v: „The parathyroids“ (Bilezikian, J. P. *a kol.*), Raven press, New York (1994) str. 239). PTHrP může způsobovat hyperkalcinémii, hypofosfátonémii, snížení renální kapacity resorpce fosforu, zvýšení renální exkrece cAMP a další stavy, které byly u HHM zjištěny.

Jak je uvedeno výše, PTHrP se nevztahuje pouze k hyperkalcinémii související s maligním nádorem, ale také způsobuje hyperkalcinemickou krizi včetně zhoršení vědomí (např. obecná netečnost a zmatení) a kóma, k nimž dochází v důsledku rychlého zvýšení hladiny vápníku v krvi. V případě, že je zjištěna hyperkalcinemická krize související s maligním nádorem, jsou podávány kalcitonin, steroid, bisfosfonát, fosfátový pufr, fyziologický roztok, furosemid nebo podobné látky. Cílem je zlepšit hyperkalcinémii a celkový stav. Tyto léky však mají své nevýhody a to, že při podávání mohou být sníženy terapeutické účinky, mohou být způsobeny těžké negativní vedlejší účinky a vývoj farmakologických účinků může být zdržen. Proto se tedy předpokládá použití takových léků, které mají vyšší terapeutické účinky a nižší vedlejší účinky.

Konkrétně u pacientů s hyperkalcinemickou krizí, u nichž může někdy vést velké zvýšení hladiny vápníku v krvi až ke smrti, je třeba snížit hladinu vápníku v krvi na nejnižší možnou hladinu. Do současné doby však není znám žádný lék, který by byl uspokojivý jakožto bezpečné, okamžité terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi.

Jako nový přístup k léčbě hyperkalcinémie související s maligním nádorem byl autorem Kukreja, S. C. *a kol.* uveden postup, kdy bylo athymické myši, které byly za účelem vyvolání hyperkalcinémie transplantovány buňky lidského plicního karcinomu nebo buňky faryngálního karcinomu, podáno neutralizační antisérum proti PTHrP. Výsledkem bylo snížení hladiny vápníku v krvi a hladiny cAMP v moči (J. Clin. Invest. (1988) 82, 1798 až 1802). Autoři Kanji Sato *a kol.* také uvedli, že jestliže byla podána nahé myši, které byl transplantován lidský nádor produkující PTHrP, protilátka proti PTHrP (1 až 34), byla hyperkalcinémie zlepšena a doba přežití myši byla podstatně prodloužena (J. bone & Mine. Res. (1993) 8, 849 až 860). Japonská patentová přihláška č. 4-228089 odhaluje myši/lidskou chimerickou protilátku proti lidskému PTHrP (1 až 34).

Jak je uvedeno výše, u polidštěných protilátek se předpokládá, že je bude možno využít v naléhavé léčbě hyperkalcinemické krize související s maligním nádorem. Polidštěná protilátka proti PTHrP však dosud známa není a výše zmíněné dokumenty tyto polidštěné protilátky nepředpokládají. Kromě toho také neexistuje žádný způsob přípravy polidštěných protilátek, který by byl obecně aplikovatelný na libovolnou protilátku. Při výrobě polidštěných protilátek s uspokojivou schopností vázat se na specifický antigen a tím jej neutralizovat jsou tedy potřebné různé modifikace nebo vynálezy (viz například Sato, K. *a kol.* Cancer Res., 53, 851 až 856, 1993).

Podstata vynálezu

Předmětem předmětného vynálezu je poskytnout terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi, obsahující jako aktivní složku, látku, schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem příbuzným parathyroidnímu hormonu (PTHrP) a jeho receptorem.

Autoři předmětného vynálezu provedli rozsáhlé a intenzivní studie týkající se vývoje tohoto terapeutického činidla. Výsledkem bylo zjištění autorů, že k dosažení předmětu vynálezu může vést použití látky, schopné inhibovat vazbu PTHrP na receptor .

To znamená, že se předmětný vynález vztahuje k terapeutickému činidlu na hyperkalcinemickou krizi, které obsahuje jako aktivní složku látku, schopnou inhibovat vazbu mezi PTHrP a receptorem. Látka zahrnuje antagonistu proti PTHrP receptoru a protilátku proti

PTHrP. Touto látkou může být jakýkoliv fragment protilátky proti PTHrP a/nebo jakákoliv modifikovaná forma fragmentu. Protilátkou (včetně monoklonální) může být polidštěná nebo chimerická forma (jako např. v případě polidštěné protilátky polidštěná protilátka #23-57-137-1).

Předmětný vynález se rovněž vztahuje k terapeutickému činidlu na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem, které obsahuje jako aktivní složku látku, schopnou inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem.

Dále bude vynález popsán podrobněji.

Předmětný vynález se týká terapeutického činidla na hyperkalcinemickou krizi, které obsahuje jako aktivní složku látku, schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem příbuzným parathyroidnímu hormonu (dále označován jako „PTHrP“) a jeho receptorem.

Zde používaný termín „látka schopná inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem“ se vztahuje k libovolné látce, která se může vázat na PTHrP tak, aby inhibovala vazbu PTHrP na PTHrP receptor nebo k libovolné látce, která se může vázat na PTHrP receptor tak, aby inhibovala vazbu PTHrP na PTHrP receptor. Specifickým příkladem látky, uvedené jako první, je protilátka proti PTHrP a specifickým příkladem látky, uvedené na druhém místě, je antagonist proti PTHrP receptoru (který je také označován jako „antagonista PTHrP“).

Antagonista PTHrP zahrnuje polypeptid a nízkomolekulární látku. Mezi PTHrP antagonisty jsou zahrnuty například látky, které se mohou vázat na PTHrP receptor antagonisticky proti PTHrP, jako jsou polypeptidy, popsané v japonské patentové přihlášce č. 7-165790, Peptides (United States), 1995, 16(6), 1031 až 1037, Biochemistry (United States) 28. dubna 1992, 31(16) 4026 až 4033 a v japonské národní přihlášce č. 5-509098. Tyto polypeptidy mohou být chemicky syntetizovány podle obecných postupů.

Antagonisty PTHrP jsou sice schopny soutěžit s přirozeně se vyskytujícím PTHrP peptidem o vazbu na PTHrP receptor, ale inhibují signální transdukci, která se vyskytuje jako následek vazby, čímž zabráňují zvýšení hladiny vápníku.

Polypeptidy mohou obsahovat mutaci (např. delecí, nahrazení, adici nebo inzerci) alespoň jednoho aminokyselinového zbytku a to do té míry, dokud mohou vykazovat ekvivalentní antagonistické aktivity, které jsou také zahrnuty v PTHrP antagonistech podle předmětného vynálezu.

Výhodněji může terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle předmětného vynálezu snižovat hladinu vápníku rychle po podání činidla pacientovi v dávce výhodně 0,1 až 10 000 mg/jedince, výhodněji 0,5 až 1 000 mg/jedince, ještě výhodněji 1 až 100 mg/jedince. Dále může zabránovat opětovnému zvýšení hladiny vápníku po delší časovou periodu nebo může vykazovat výrazně delší trvání účinku. Specificky je činidlem používaným jako

terapeutické činidlo podle předmětného vynálezu jedno z těchto činidel, které mohou snižovat upravenou hladinu vápníku v séru o 1 mg/dl nebo více nebo mohou normalizovat upravenou hladinu vápníku v séru (upravená hladina vápníku v séru: 10,4 mg/dl nebo nižší) nebo mohou snižovat upravenou hladinu vápníku v séru o 2 mg/dl nebo více, v průběhu 24 h, výhodněji v průběhu 6 h, ještě výhodněji v průběhu 4 h po podání činidla. Ještě výhodněji může činidlo udržovat takový stav, kdy se upravená hladina vápníku v séru opětovně nezvýší nebo může udržovat takový stav, kdy je upravená hladina vápníku v séru ve srovnání s hladinou před podáním činidla snížena o 2 mg/dl nebo více nebo může normalizovat upravenou hladinu vápníku v séru do 24 h, výhodněji 3 dnů, ještě výhodněji 5 dnů, ještě více výhodněji 7 dnů a nejvýhodněji 10 dnů po podání činidla.

„Upravená hladina vápníku v séru“, která je zde používána, může být spočítána podle obecných rovnic, záviselých na hladině albuminu v séru:

- (1) hladina sérového albuminu nižší než 4 g/dl:

$$\begin{aligned} \text{upravená hladina vápníku v séru (mg/dl)} &= \\ &= \text{měřená hladina vápníku v séru (mg/dl)} + [4,0 - \text{hladina sérového albuminu (g/dl)}] \end{aligned}$$

- (2) hladina sérového albuminu 4 g/dl nebo vyšší:

$$\text{upravená hladina vápníku v séru (mg/dl)} = \text{měřená hladina vápníku v séru (mg/dl)}$$

Nejlepší způsob provedení vynálezu

Předmětný vynález bude podrobněji popsán níže, zejména použitím protilátky proti PTHrP jakožto „látky schopné inhibovat vazbu mezi PTHrP a PTHrP receptorem“.

Protilátka proti PTHrP zahrnuje například známé protilátky jako jsou polidštěná protilátka, lidská protilátka (WO 96/33735) a chimerická protilátka (japonská patentová přihláška č. 4-228089), rovněž také protilátka odhalená v předmětném vynálezu (protilátka # 23-57-137-1). Protilátka může být polyklonálního typu, ale výhodněji je monoklonálního typu.

Protilátka proti PTHrP

Protilátka proti PTHrP, používaná v předmětném vynálezu, může být jakákoliv protilátka, která může vykazovat terapeutický účinek na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem, bez ohledu na její zdroj, typ (monoklonální nebo polyklonální) a konfiguraci.

Protilátka proti PTHrP, používaná v předmětném vynálezu, může být produkována známým způsobem a to ve formě polyklonální nebo monoklonální protilátky. Výhodněji je protilátka proti PTHrP monoklonální protilátka savčího původu. Monoklonální protilátka savčího původu zahrnuje takové protilátky, které jsou produkovány z hybridomu a takové protilátky, které jsou produkovány pomocí genového inženýrství z hostitele, který je transformován rekombinantním expresním vektorem, který nese gen pro protilátku. Protilátka použitá v předmětném vynálezu se může vázat na PTHrP s cílem inhibovat vazbu PTHrP na PTH/PTHrP receptor, čímž dochází k blokování signální transdukce PTHrP a následkem toho k inhibici biologické aktivity PTHrP.

Přesnějším příkladem protilátky je protilátka #23-57-137-1, která může být produkována z hybridomového klonu #23-57-137-1.

Hybridomový klon #23-57-137-1 byl označen jako „myší-myší hybridom #23-57-137-1“ a byl 15. srpna 1996 uložen za podmínek Budapešťské dohody v National Institute of Bioscience and Human-technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japonsko (1 až 3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko) pod přístupovým číslem FERM BP-5631.

Hybridom produkující protilátky

Hybridom produkující monoklonální protilátku může být v podstatě produkován pomocí známých technik. To znamená, že PTHrP je v souladu s běžným imunizačním postupem použit jako antigen pro imunizaci. Výsledné imunocyty jsou pomocí běžných metod buněčné fúze fúzovány do známých rodičovských buněk a z fúzovaných buněk jsou pomocí běžně používaných testovacích postupů testovány a vybírány ty buňky, které produkují monoklonální protilátky.

Buňky produkující monoklonální protilátky mohou být přesněji připraveny následujícím způsobem.

Nejdříve je připraven lidský PTHrP, který je použit jako citlivý antigen pro přípravu protilátky. K přípravě je použita exprese aminokyselinové sekvence PTHrP genu, odhalená v publikaci Suva L. J. a kol., Science (1987) 237, 893. To znamená, že nukleotidová sekvence kódující PTHrP je inzertována do jakéhokoli známého expresního vektoru a tímto vektorem je transformována vhodná hostitelská buňka. PTHrP protein je poté jakýmkoliv známým postupem z transformované hostitelské buňky nebo ze supernatantu kultury transformované hostitelské buňky izolován a přečištěn.

Přečištěný PTHrP protein je poté použit jako citlivý antigen. Příležitostně může být jako citlivý antigen použit peptid o 34 aminokyselinách (sekvence s identifikačním číslem 75, SEQ ID No: 75) z N-koncové oblasti PTHrP, který může být syntetizován chemicky.

Savec, který může být citlivým antigenem imunizován, není konkrétně vymezen. Výhodně je však savec vybírán s ohledem na slučitelnost s rodičovskou buňkou, která bude použita pro fúzi buněk. Obecně mohou být zvoleni hlodavci (např. myš, potkan nebo křeček), králík nebo opice.

Imunizace savce citlivým antigenem může být uskutečněna v souladu s libovolným známým postupem, například aplikací citlivého antigenu savci injekčně a to intraperitonálně nebo podkožně. Ještě přesněji je citlivý antigen suspendován v pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS) nebo fyziologickém roztoku a vzniklá suspenze je poté smíchána s odpovídajícím množstvím adjuvants (např. Freundovo kompletní adjuvants) za vzniku emulze. Emulze je aplikována injekčně savci několikrát v intervalech 4 až 21 dní. Při imunizaci může být antigen ukotven na vhodný nosič.

Po imunizaci je sledována hladina protilátek v séru. Jestliže je zjištěno, že hladina protilátek v séru dosáhla žádoucí hodnoty, jsou imunocyty ze savce izolovány a poté jsou podrobeny buněčné fúzi. Výhodnějším imunocytem je slezinná buňka.

Rodičovskou buňkou použitou pro fúzi buněk (tzn. protějšek buněčné fúze s imunocytem) je myelomová buňka pocházející ze savce. Myelomová buňka je z jakékoliv známé buněčné linie např. P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548 až 1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1 až 7), NS-1 (Kohler, G. a Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511 až 519), MPC-11 (Margulies, D. H. *a kol.*, Cell (1976) 8, 405 až 415), SP2/0 (Shulman, M. *a kol.*, Nature (1978) 276, 269 až 270), FO (de St. Groth, S. F. *a kol.*, J. Immunol. Methods (1980) 35, 1 až 21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313 až 323) nebo R210 (Galfre, G. *a kol.*, Nature (1979) 277, 131 až 133).

Buněčná fúze imunocytu do myelomové buňky je uskutečněna v souladu se známým postupem jako je např. postup podle Milsteina *a kol.* (Kohler, G. a Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3 až 46), který je možno výhodněji použít.

Ještě přesněji je fúze buněk uskutečněna například v běžném nutričním kultivačním médiu v přítomnosti promotoru. Touto látkou může být například polyethylenglykol (PEG) nebo virus Sendai (japonský hemaglutinační virus, HJV). V případě potřeby může být pro účely zvýšení účinnosti fúze použita také přísada jako je dimethylsulfoxid.

Poměr mezi imunocyty a myelomovými buňkami pro fúzi buněk může být libovolný. Například imunocyty jsou používány v množství 1 až 10 krát vyšším než myelomové buňky. Médium použité pro fúzi buněk může být například RPMI 1640 nebo MEM, které jsou vhodné pro růst linie myelomových buněk nebo jiné médium, běžně používané pro kultivaci těchto buněk. V případě potřeby může být do kultivačního média přidán sérový doplněk jako je zárodečné telecí sérum (FCS).

Buněčná fúze je prováděna tak, že v kultivačním médiu jsou smíchány imunocyty a myelomové buňky v daných množstvích, poté je přidán roztok PEG (např. méněná molekulová hmotnost: asi 1000 až 6000) (který byl předem zahřát na teplotu asi 37 °C) obvykle do koncentrace 30 až 60 % a poté je výsledný roztok míchán, čímž dochází ke vzniku fúzních buněk (hybridomů). Následně je do roztoku kultury přidáno odpovídající kultivační médium a roztok je odstředěn, aby byl odstraněn supernatant. Tento postup je opakován několikrát, aby byla odstraněna látka, podporující buněčnou fúzi a podobné látky, které nejsou žádoucí pro růst hybridomů.

Získané hybridomy mohou být selektovány kultivací ve vhodném selektivním médiu jako je např. hypoxanthin-aminopterin-thymidinové médium (HAT). Hybridomová kultura v HAT médiu je ponechána po dobu, dostatečnou pro smrt jiných buněk než jsou žádoucí hybridomové (tzn. buňky, které nefúzí), obvykle po dobu několika dnů až týdnů. Poté je použit postup limitovaného ředění s cílem otestovat, vybrat a klonovat hybridomy, které vylučují požadovanou protilátku.

Příležitostně může být lidská protilátka mající vazebnou aktivitu vůči PTHrP připravena *in vitro* senzitivizací lidského lymfocytu s PTHrP a poté podrobením senzitivizovaného lymfocytu buněčné fúzi s myelomovou buňkou lidského původu, schopnou nekonečného růstu (Japonská patentová přihláška č. 1-59878). Příležitostně může být lidská protilátka proti PTHrP připravena injektováním PTHrP jakožto antigenu do transgenního zvířete, které má celý soubor genů lidské protilátky, za vzniku buňky produkující protilátku proti PTHrP a učiněním buněk nesmrtelnými, čímž může být lidská protilátka produkována nesmrtelnými buňkami (mezinárodní přihlášky č. WO 94/25585, WO 93/12227, WO 92/03918 a WO 94/02602).

Hybridom produkující monoklonální protilátky, připravený výše uvedeným postupem může být pasážován v běžném kultivačním médiu a skladován pod kapalným dusíkem velmi dlouho.

Pro přípravu monoklonální protilátky z hybridomu může být použit způsob, zahrnující kultivaci hybridomu v souladu s běžným způsobem a shromáždění monoklonální protilátky ze supernatantu kultury nebo může být použit způsob, zahrnující injektování hybridomu savci

kompatibilnímu s hybridomem s cílem dosáhnout růstu hybridomu v těle savce a shromáždění hybridomu z ascitu savce. Způsob, uvedený jako první, je vhodný pro přípravu vysoce přečištěné protilátky, zatímco druhý uvedený způsob je vhodný pro přípravu protilátek ve větším množství.

Rekombinantní protilátka

V předmětném vynálezu může být použita také monoklonální protilátka rekombinantního typu, která může být připravena klonováním genu protilátky z hybridomu, začleněním genu protilátky do vhodného vektoru, začleněním vektoru do hostitele a produkcí protilátek hostitelem. K tomu se použijí běžné genetické rekombinantní techniky (viz např. Vandamme, A. M. *a kol.*, Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767 až 775).

Ještě přesněji, je mRNA kódující variabilní (V) oblast protilátky proti PTHrP izolována z hybridomu, který produkuje protilátku proti PTHrP. Izolace mRNA může být uskutečněna tak, že je libovolným známým postupem jako je ultracentrifugace v přítomnosti guanidinia (Chirgwin, J. M. *a kol.*, Biochemistry (1979) 18, 5294 až 5299) a AGPC postup (Chomczynski, P. *a kol.*, Anal. Biochem (1987) 162, 156 až 159) připravena celková RNA a poté je z celkové RNA připravena požadovaná mRNA a to pomocí soupravy mRNA Purification Kit (Pharmacia) apod. Příležitostně může být mRNA připravena také přímo pomocí soupravy QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

Dále je z mRNA syntetizována pomocí reverzní transkriptázy cDNA pro V-oblast protilátky. Syntéza cDNA je uskutečněna pomocí soupravy AMV Reverse Transkriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Corporation) nebo jí podobných. cDNA může být také syntetizována nebo amplifikována pomocí 5'-RACE postupu (Frohman, M. A. *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998 až 9002; Belyavsky, A. *a kol.*, Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919 až 2932) s využitím soupravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech) v kombinaci s PCR apod.

DNA fragment, který je předmětem zájmu, je z výsledného produktu PCR izolován a přečištěn a poté je ligován do DNA vektoru s cílem získat rekombinantní vektor. Rekombinantní vektor je začleněn do hostitele jako je *E. coli* a kolonie, obsahující žádoucí rekombinantní vektor, je vyselektována. Nukleotidová sekvence požadované DNA v rekombinantním vektoru je potvrzena např. pomocí postupu dideoxynukleotidové terminace řetězce.

Jakmile je získána DNA kódující V-oblast protilátky proti PTHrP, je integrována do expresního vektoru, obsahujícího DNA, která kóduje konstantní (C) oblast protilátky.

Při přípravě protilátky proti PTHrP, používané v předmětném vynálezu, je gen pro protilátku integrován do expresního vektoru tak, že gen pro protilátku může být exprimován pod kontrolou expresních kontrolních oblastí (např. zesilovač, promotor). Hostitelská buňka je transformována expresním vektorem s cílem exprimovat protilátku.

Při expresi genu pro protilátku mohou být DNA kódující těžký (H) řetězec a DNA kódující lehký (L) řetězec protilátky integrovány do různých expresních vektorů. Poté bude hostitelská buňka transformována oběma výslednými rekombinantními expresními vektory. Příležitostně mohou být integrovány jak DNA kódující H-řetězec tak i DNA kódující L-řetězec protilátky společně do jediného expresního vektoru a potom bude hostitelská buňka transformována výsledným rekombinantním expresním vektorem (WO 94/11523).

Při přípravě rekombinantní protilátky může být jako hostitel použito namísto výše uvedených hostitelských buněk transgenní zvíře. Například, gen pro protilátku je inzertován do předem určeného místa genu, kódujícího protein, který je produkován v mléce zvířete (např. kozlí β -kasein), čímž je produkován fúzní gen. DNA fragment obsahující fúzní gen se začleněným genem pro protilátku je injektován do embrya kozy a embryo je poté převedeno do samice. Koza nesoucí embryo může rodit transgenní kozu. Sledovaná protilátka je vylučována v mléce transgenní kozy nebo jejích potomků. Za účelem zvýšení množství mléka obsahujícího protilátku může být transgenní koze podáván vhodný hormon (Ebert, K. M. a kol., Bio/Technology (1994) 12, 699 až 702).

Modifikovaná protilátka

V předmětném vynálezu může být za účelem snížení heterogenity vůči lidskému tělu apod. použita uměle modifikovaná rekombinantní protilátka jako je chimerická protilátka a polidštěná protilátka. Tyto modifikované protilátky mohou být připraveny jakýmkoliv známým postupem.

Chimerická protilátka, kterou lze použít v předmětném vynálezu, může být připravena ligací DNA kódující V-oblast protilátky, připravené výše uvedeným postupem, do DNA kódující C-oblast lidské protilátky, integrováním produktu ligace do expresního vektoru a začleněním vzniklého rekombinantního expresního vektoru do hostitele, čímž dojde k produkci chimerické protilátky.

Polidštěná protilátka je také označována jako „strukturovaná lidská protilátka“, ve které jsou oblasti (CDR) protilátky savce jiného než člověk (např. myši), které určují

komplementaritu, roubovány na stejné oblasti lidské protilátky. Obecný postup genetické rekombinace pro přípravu této polidštěné protilátky je rovněž znám (EP 125023; WO 96/02576).

Přesněji, je navržena DNA sekvence, ve které jsou ligovány CDR oblasti myší protilátky do oblasti základní struktury (FR), je syntetizována pomocí PCR s použitím několika oligonukleotidů jakožto primerů, které byly navrženy tak, aby měly oblasti překrývající se s terminálními oblastmi CDR a FR. Výsledná DNA je ligována do DNA kódující C-oblast lidské protilátky a produkt ligace je integrován do expresního vektoru. Výsledný rekombinantní expresní vektor je začleněn do hostitele, čímž dojde k produkci polidštěné protilátky (EP 239044, WO 96/02576).

FR oblasti ligované do CDR jsou vybrány tak, že CDR mohou tvořit vhodné místo pro vazbu antigenu. V případě potřeby může být aminokyselina(y) v FR oblastech V-oblasti protilátky nahrazena tak, že CDR strukturované lidské protilátky mohou tvořit odpovídající vazebné místo pro antigen (Sato, K. *a kol.*, Cancer Res. (1993) 53, 851 až 856).

C-oblast chimerické nebo polidštěné protilátky může být C-oblast libovolné lidské protilátky jako např. Cy1, Cy2, Cy3 nebo Cy4 pro H-řetězec a Ck nebo Cl pro L-řetězec. C-oblast lidské protilátky může být za účelem zlepšení stability protilátky nebo pro zajištění stabilní produkce protilátky modifikována.

Chimerická protilátka je složena z V-oblastí, pocházejících ze savčí avšak jiné než lidské protilátky a z C-oblastí, pocházejících z lidské protilátky. Polidštěná protilátka je složena z CDR, odvozených ze savčí avšak jiné než lidské protilátky a z FR a C-oblastí, pocházejících z lidské protilátky. Polidštěná protilátka je užitečná zejména jako aktivní přísada terapeutického činidla předmětného vynálezu, protože antigenicita protilátky proti lidskému tělu je snížena.

Specifickým příkladem polidštěné protilátky, užitečné pro předmětný vynález, je polidštěná protilátka #23-57-137-1, ve které jsou CDR pocházející z myší protilátky #23-57-137-1; L-řetězec je složen z CDR ligovaných přes tři FR (FR1, FR2 a FR3) pocházejících z lidské protilátky HSU 03868 (Gen-Bank, Deftos, M. *a kol.*, Scand. J. Immunol., 39, 95 až 103, 1994) a FR (FR4), pocházející z lidské protilátky S25755 (NBRF-PDB); H-řetězec je složen z CDR ligovaných přes FR, pocházejících z lidské protilátky S31679 (NBRF-PDB, Cuisinier, A., M. *a kol.*, Eur. J. Immunol. 23, 110 až 118, 1993), ve které je část aminokyselinových zbytků v FR nahrazena tak, že strukturovaná polidštěná protilátka může vykazovat vazebnou aktivitu vůči antigenu.

Kmeny *E. coli* obsahující plasmidy, které mají DNA kódující H-řetězec a L-řetězec polidštěné protilátky #23-57-137-1, jsou označeny *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) (pro H-řetězec) a *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) (pro

L-řetězec). Tyto kmeny byly uloženy za podmínek Budapešťské dohody 15. srpna 1996 v National Institute of Bioscience and Human-technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japonsko (1 až 3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko) pod přístupovým číslem FERM BP-5629 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) a pod přístupovým číslem FERM BP-5630 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19).

Varianty protilátky

Protilátkou, použitou v předmětném vynálezu, může být jakýkoliv její fragment nebo modifikovaný produkt fragmentu a to do té míry, dokud se může vázat na PTHrP a inhibovat aktivitu PTHrP. Fragment protilátky zahrnuje například Fab, F(ab')₂, Fv nebo jeden řetězec Fv (scFv) složený z Fv fragmentu H-řetězce nebo Fv fragmentu L-řetězce spojených prostřednictvím vhodného spojovače. Přesněji mohou být tyto fragmenty protilátek připravovány štěpením protilátky enzymem (např. papain, pepsin) na fragmenty nebo sestrojením genu, který kóduje fragment protilátky, začleněním tohoto genu do expresního vektoru a začleněním výsledného rekombinantního expresního vektoru do vhodné hostitelské buňky, čímž je exprimován fragment protilátky (viz například Co, M. S., *a kol.*, J. Immunol. (1994), 152, 2968 až 2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989), 178, 476 až 496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 476 až 496, Academic Press, Inc; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652 až 663; Rousseaux, J. *a kol.*, Methods in Enzymology (1989) 121, 663 až 669; Bird, R. E. *a kol.*, TIBTECH (1991) 9, 132 až 137).

Fragment scFv může být připraven ligací V-oblasti H-řetězce do V-oblasti L-řetězce přes spojovač, výhodně peptidový spojovač (Huston, J. S. *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879 až 5883). V-oblast H-řetězce a V-oblast L-řetězce v scFv mohou pocházet z kterékoliv zde dříve popsané protilátky. Peptidový spojovač, který váže V-oblasti, může být jakýkoliv jednořetězcový peptid například o 12 až 19 aminokyselinách.

DNA kódující scFv může být připravena nejdříve oddělenou amplifikací DNA kódující V-oblast H-řetězce a DNA kódující V-oblast L-řetězce protilátky. Jako templáty jsou použity DNA fragment kódující celou oblast H-řetězce nebo její část, která zahrnuje V-oblast a DNA fragment kódující celou oblast L-řetězce nebo její část, která obsahuje V-oblast. Dále jsou použity páry primerů, které definují terminální konce DNA fragmentů. Poté je amplifikována DNA kódující peptidový spojovač, a to s použitím DNA fragmentu kódujícího peptidový spojovač jakožto matrice a primerového páru, který definuje terminální konce DNA fragmentu

tak, že terminální konce peptidového spojovače jsou ligovány do V-oblasti H-řetězce a V-oblasti L-řetězce.

Jakmile je připravena DNA, kódující scFv, může být připraven expresní vektor nesoucí DNA a tímto expresním vektorem může být transformován hostitel. K tomuto lze použít běžné postupy. Fragment scFv může být z transformovaného hostitele získán libovolným obecným postupem.

Fragmenty protilátky, používané v předmětném vynálezu, mohou být získány přípravou genů pro tyto fragmenty a následnou expresí těchto genů ve vhodných hostitelích, což je popsáno výše. Tyto fragmenty protilátek jsou rovněž obsaženy v „protilátce“ podle předmětného vynálezu.

Jako modifikovaná forma výše zmíněných protilátek může být použita také například protilátka proti PTHrP, konjugovaná na určitou molekulu (např. polyethylenglykol). Tato modifikovaná protilátka je také zahrnuta v „protilátce“ podle předmětného vynálezu. Modifikované protilátky mohou být připraveny chemickými modifikacemi protilátek. Techniky chemické modifikace vhodné pro tento účel byly již uvedeny v kapitole dosavadní stav techniky.

Exprese a příprava rekombinantní protilátky nebo modifikované protilátky

Gen pro protilátku, zkonstruovaný výše uvedeným postupem, může být exprimován a získán známými postupy. Pro expresi v savčí buňce jsou operativně spojeny obecně užitečný promotor, gen pro protilátku, který má být exprimován a poly(A) signál (umístěný proti směru transkripce (downstream) k 3' konci genu pro protilátku). Jako užitečný systém promotor/zesilovač může být použit například systém lidského cytomegaloviru rané fáze.

Pro expresi protilátky v předmětném vynálezu mohou být použity rovněž jiné systémy promotor/zesilovač např. takové, které pocházejí z virů (např. retroviru, polyomového viru, adenoviru a opičího viru 40 (SV40)) a takové, které pocházejí ze savčích buněk (např. lidský elongační faktor 1 α (HEF1 α)).

V případě, že je použit systém promotor/zesilovač z SV40, může být exprese genu provedena velice snadno podle postupu Mulligana *a kol.* (Nature (1979) 277, 108). Jestliže je použit systém promotor/zesilovač z HEF1 α , může být exprese genu provedena velice jednoduše postupem podle Mizushima *a kol.* (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

Pro expresi v *E. coli* mohou být operativně spojeny běžně užitečný promotor, signální sekvence pro sekreci sledované protilátky a gen pro protilátku. Jako promotor může být použit *lacZ* promotor nebo *araB* promotor. Jestliže je použit *lacZ*, může být exprese genu provedena

postupem podle Warda *a kol.* (Nature (1998) 341, 544 až 546; FASEB J. (1992) 6, 2422 až 2427), zatímco ještě je použit *araB* promotor, pak je možno expresi genu uskutečnit postupem podle Bettera *a kol.* (Better *a kol.*, Science (1988) 240, 1041 až 1043).

Z pohledu signální sekvence pro sekreci protilátky, předpokládá-li se, že je sledovaná protilátka vylučována do periplasmatického prostoru *E. coli*, může být použita signální sekvence *pelB* (Lei, S. P. *a kol.*, J. Bacteriol. (1987) 169, 4379). Protilátka, vylučovaná do periplasmatického prostoru, je izolována a poté je opětovně sbalena tak, že se nachází v odpovídající konfiguraci.

Je možno použít replikační počátek, pocházející z virů (např. SV40, polyomového viru, adenoviru, hovězího papilomového viru (BPV)) apod. Aby byl zvýšen počet kopií genu v hostitelském buněčném systému, může expresní vektor dále obsahovat selektivní značkový gen, jako je gen pro aminoglykosidfosfotransferázu (APH), gen thymidinkinázy (TK), gen xanthinguaninfosforibosyltransferázy z *E. coli* (Ecogpt) a gen dihydrofolátreduktázy (*dhfr*).

Pro přípravu protilátky používané v předmětném vynálezu může být použit jakýkoliv expresní systém včetně eukaryotických a prokaryotických buněčných systémů. Mezi eukaryotické buňky patří určené linie buněk živočichů (např. savců, hmyzu, hub a plísň, kvasinek). Prokaryotické buňky zahrnují bakteriální buňky jako jsou buňky *E. coli*.

Je výhodné, aby byla protilátka užitečná v předmětném vynálezu exprimována v savčí buňce jako jsou buňky CHO, COS, myelomové, BHK, Vero a HeLa.

Transformovaná hostitelská buňka je dále kultivována *in vitro* nebo *in vivo* s cílem produkovat požadovanou protilátku. Kultivace hostitelské buňky může být uskutečněna jakýmkoliv známým způsobem. Kultivační médium, které lze použít v předmětném vynálezu, může být DMEM, MEM, RPMI 1640 nebo IMDM. Kultivační médium může obsahovat sérové doplňky jako je FCS.

Izolace a přečištění protilátky

Protilátka, exprimovaná a produkována výše uvedeným postupem, může být z buněk nebo hostitelského zvířete izolována a přečištěna do homogenity. Izolace a přečištění protilátky používané v předmětném vynálezu může být provedeno na afinitní koloně. Příkladem kolony s proteinem A jsou Hyper D, POROS a Sepharose F.F. (Pharmacia). Rovněž mohou být použity jiné metody běžně používané pro izolaci a přečištění protilátek; způsob tedy není konkrétně vymezen. Například mohou být použity chromatografie s různými kolonami včetně výše zmíněné afinitní chromatografie, filtrace, ultrafiltrace, odsolení a dialýza. Metody mohou být použity

samostatně nebo v kombinaci s cílem izolovat a přechistit požadovanou protilátku (Antibodies A Laboratory Manual. Ed. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

Stanovení aktivit protilátky

Stanovení vazebné aktivity pro antigen (Antibodies A Laboratory Manual. Ed. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) nebo inhibiční aktivity vůči receptoru pro ligand (Harada, A. *a kol.*, International Immunology (1993) 5, 681 až 690) u protilátky používané v předmětném vynálezu může být provedeno jakýmkoliv známým postupem.

Jako způsob stanovení vazebné aktivity pro antigen u protilátky proti PTHrP, používané v předmětném vynálezu, může být použita například ELISA (heterogenní enzymoimunoanalýza), EIA (enzymoimunoanalýza), RIA (radioimunoanalýza) nebo technika s využitím fluorescenčně značené protilátky. Například, je-li použita enzymoimunoanalýza, je do destičky předem potažené PTHrP (1 až 34) přidán roztok vzorku, obsahující protilátku proti PTHrP (např. supernatant kultury buněk produkujících protilátku proti PTHrP nebo protilátka proti PTHrP *per se* v přečištěné formě). Poté je do destičky přidána sekundární protilátka označená enzymem (např. alkalická fosfatáza). Destička je inkubována a promyta. Poté je přidán substrát pro enzym (např. p-nitrofenylfosforečná kyselina) a je měřena absorbance roztoku v destičce, čímž je stanovena vazebná aktivita antigen-protilátka.

Pro potvrzení aktivity protilátky používané v předmětném vynálezu byla stanovena neutralizační aktivita protilátky (např. protilátky proti PTHrP).

Způsoby podávání a farmaceutické preparáty

Terapeutické činidlo podle předmětného vynálezu může být použito pro léčbu nebo zlepšení hyperkalcinemické krize související s maligním nádorem.

Účinná jednotlivá dávka může být zvolena v rozsahu od 0,001 do 1,000 mg/kg hmotnosti. Příležitostně může být dávka pro pacienta vybrána z rozsahu od 0,01 do 100,00 mg/kg hmotnosti, výhodně 0,1 až 10,0 mg/kg, výhodněji 0,5 až 1,0 mg/kg, ještě výhodněji 1 až 100 mg/kg. Dávka terapeutického činidla obsahujícího protilátku proti PTHrP podle předmětného vynálezu však není konkrétně na výše uvedené rozsahy omezena.

Terapeutické činidlo může být podáváno pacientovi v jakémkoliv stádiu včetně před nebo po vzniku hyperkalcinemické krize související s maligním nádorem. Příležitostně může být terapeutické činidlo podáváno ve stádiu, kdy je u pacienta zjištěna ztráta hmotnosti.

Terapeutické činidlo obsahující protilátku proti PTHrP jakožto aktivní složku podle předmětného vynálezu může být formulováno libovolným známým postupem (Remington's Pharmaceutical Science, poslední vydání, Mark Publishing Company, Easton, USA). Formulace může dále zahrnovat farmaceuticky přijatelné nosiče a aditiva.

Mezi příklady těchto nosičů a aditiv je možno zařadit vodu, farmaceuticky přijatelná organická rozpouštědla, kolagen, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidon, karboxyvinylový polymer, karboxymethylcelulózu sodnou, poly(akrylát sodný), arginát sodný, ve vodě rozpustný dextran, karboxymethylškrob sodný, pektin, methylcelulózu, ethylcelulózu, xanthanovou gumu, arabskou gumu, kasein, agar, polyethylenglykol, diglycerin, glycerin, propylenglykol, vazelínu, parafin, stearylalkohol, kyselinu stearovou, lidský sérový albumin (HSA), manitol, sorbitol, laktózu a povrchově aktivní činidla přijatelná jako farmaceutická aditiva.

V praxi je aditivum vybíráno z výše uvedených látek, které se používají buď jednotlivě nebo v kombinaci podle formy aplikované dávky, ale výběr není výše zmíněnými látkami limitován. Například může být použita forma injekce, která je připravena rozpuštěním protilátky proti PTHrP v přečištěné formě v rozpouštědle (např. fyziologický roztok, pufr, roztok hroznového cukru) a poté je do roztoku přidáno činidlo, zabraňující adsorpci (např. Tween 80, Tween 20, želatina, lidský sérový albumin). Terapeutické činidlo podle předmětného vynálezu může být také v rekonstitutivní formě, lyofilizované formě, která je před použitím rozpuštěna. Pro přípravu lyofilizované formy dávky mohou být přidány pomocné látky jako je cukerný alkohol (např. manitol, glukóza) a cukr.

Přehled obrázků ve výkresech

Obr. 1 je grafické znázornění terapeutického účinku (pokud jde o změnu hladiny ionizovaného vápníku v krvi) myší protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem.

Obr. 2 je grafické znázornění terapeutického účinku (pokud jde o změnu tělesné hmotnosti) myší protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem.

Obr. 3 je grafické znázornění terapeutického účinku (pokud jde o změnu hladiny ionizovaného vápníku v krvi) polidštěné protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem.

Obr. 4 je grafické znázornění terapeutického účinku (pokud jde o změnu tělesné hmotnosti) polidštěné protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem.

Obr. 5 je grafické znázornění terapeutického účinku (pokud jde o změnu hladiny ionizovaného vápníku v krvi) polidštěné protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem.

Obr. 6 je grafické znázornění terapeutického účinku (pokud jde o změnu tělesné hmotnosti) polidštěné protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem.

Příklady provedení vynálezu

Předmětný vynález bude dále detailněji popsán s odkazem na následující příklady, které by však neměly být sestaveny tak, aby omezovaly technický rozsah vynálezu.

Příklad 1 Farmakologický test na modelovém zvířeti s hyperkalcinemickou krizí související s maligním nádorem

Pomocí modelového zvířete s hyperkalcinemií (nahá myš s transplantovaným lidským nádorem) byl testován terapeutický účinek myši monoklonální protilátky proti PTHrP a polidštěné monoklonální protilátky proti PTHrP na hyperkalcinemickou krizi.

Jako modelová zvířata byly použity nahé myši nebo potkani, kterým byl transplantován lidský pankreatický karcinom kmen FA-6 (poskytnut profesorem Kanji Satoh, Tokyo Women's Medical University) nebo lidský plicní nádor kmen LC-6-JCK (získán z Central Institute for Experimental Animals). Je známo, že nahé myši nebo potkani s těmito transplantovanými kmeny lidských karcinomů vykazují s rostoucím růstem nádoru rychlé zvýšení hladiny vápníku v krvi a výsledkem je vznik tzv. „hyperkalcinemické krize“, doprovázené rychlou ztrátou tělesné hmotnosti a zhoršením obecného stavu, což v některých případech končí smrtí. V tomto testu bylo pozorováno, že myši monoklonální protilátky a polidštěné monoklonální protilátky zlepšují tyto stavy. Jako měřítko zlepšení byla použita tělesná hmotnost a hladina vápníku v krvi.

Pasážování a uchovávání kmene lidského karcinomu a příprava modelových zvířat

Pasážování lidského pankreatického karcinomu kmen FA-6 a lidského plicního karcinomu kmen LC-6 bylo provedeno *in vivo* pomocí BALB/c-nu/nu nahé myši (CLEA Japan, Inc.). Pro určení farmakologického účinku na myš byli zakoupeni 5 týdnů staří samci BALB/c-nu/nu nahé myši (BALB/cAJcl-nu; CLEA Japan, Inc.), kteří byli aklimatizováni 1 týden, čímž byly získány 6 týdnů staré myši, určené pro použití. Pro určení farmakologického účinku na potkany, byli zakoupeni 5 týdnů staří samci nahých potkanů (F344/NJcl-rnu; CLEA Japan, Inc.), kteří byli aklimatizováni po dobu 1 týdne, čímž byli stejným způsobem jako tomu bylo u myši získáni 6 týdnů staří potkani, kteří byly poskytnuti pro stanovení.

Připravená hyperkalcinemická modelová zvířata byla rozdělena do skupin následujícím způsobem. Pasážovaný nádor byl odstraněn a poté byl rozřezán na kostky o velikosti strany 3 mm. Výsledné čtvercové bloky karcinomu byly podkožně transplantovány do laterální oblasti každého zvířete, jeden kousek na jedno zvíře. V okamžiku, kdy bylo u každého zvířete potvrzeno, že objem nádoru je dostatečně velký a hladina ionizovaného vápníku je zvýšena, byla zvířata rozdělena do skupin a to tak, že v jednotlivých skupinách zvířat, které byly poskytnuty jako hyperkalcinemická modelová zvířata, byly zprůměrovány hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti. Myši a potkani byli rozděleni do 3 skupin; testovací skupiny, které byla podávána stanovovaná protilátka; testovací skupiny, které bylo podáváno kontrolní činidlo a kontrolní skupiny, které bylo podáváno rozpouštědlo (v tomto testu fyziologický roztok pufovaný fosfátem (PBS)).

Stanovení hladiny vápníku v krvi

Hladina vápníku v krvi každého zvířete byla stanovena 2, 4 a 24 h (v případě farmakologického testu u myši) nebo 1, 2, 4 a 24 h (v případě farmakologického testu u potkana) po podání každé protilátky. Cílem bylo určit farmakologický účinek protilátek. Hladina vápníku v krvi byla stanovena jako celková hladina ionizovaného vápníku v krvi tak, že každému zvířeti byla pomocí hematokritické zkumavky odebrána z očníce (u myši) nebo z ocasní žíly (u potkana) krev, která byla aplikována do automatického analyzátoru 643 Automatic Ca/pH Analyzer (CIBA-CORNING). Tělesná hmotnost každého zvířete byla zjištěna před a 24 h po podání protilátky.

Stanovení objemu nádoru

Objem nádoru byl stanoven prostřednictvím měření nejdelší osy (a mm) a nejkratší osy (b mm) nádoru a vynesení obou změřených hodnot do Galantovy rovnice ($ab^2/2$).

Stanovení terapeutického účinku na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem bylo provedeno následujícím způsobem.

(1) Farmakologický test na myši monoklonální protilátku (#23-57-137-1)

Při farmakologickém testu na myši monoklonální protilátku bylo rozpuštěno 100 µg protilátky v 0,1 ml PBS. Roztok byl aplikován modelové myši z testovací skupiny (která byla připravena a zařazena do skupin, což bylo popsáno výše) prostřednictvím ocasní žíly v dávce 100 µg/0,1 ml PBS/myš. Jako kontrolní činidlo byl aplikován preparát kalcitoninu („CALCITORAN“ z Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.), který se používá při léčbě hyperkalcinemické krize. Kalcitonin byl aplikován myši z druhé testovací skupiny také prostřednictvím ocasní žíly v dávce 100 U/kg. Jako kontrola byl myši z kontrolní skupiny aplikován přes ocasní žílu PBS v dávce 0,1 ml/myš. Toto vyjadřují obr. 1 a obr. 2.

(2) Farmakologický test na polidštěnou protilátku (hMBC(q))

1. Farmakologický test na hyperkalcinemické modelové myši

Při farmakologickém testu na polidštěnou protilátku byla protilátka aplikována hyperkalcinemické modelové myši z testovací skupiny a to přes ocasní žílu v dávce 30 µg/0,1 ml PBS/myš. Jako kontrolní činidlo byl myši z druhé testovací skupiny aplikován preparát kalcitoninu („Elcitonin“ z Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) a to prostřednictvím ocasní žíly v dávce 100 U/kg. Jako kontrola byl myši z kontrolní skupiny aplikován ocasní žílou PBS v dávce 0,1 ml/myš. Vše je na obr. 3 a obr. 4.

2. Farmakologický test na hyperkalcinemických modelových potkanech

Při farmakologickém testu na polidštěnou protilátku byla protilátka aplikována ocasní žílou hyperkalcinemickým modelovým potkanům z testovací skupiny v dávce 0,5 mg/1 ml

PBS/kg. Jako kontrolní činidlo byl potkanům z druhé testovací skupiny aplikován preparát kalcitoninu („Elcitonin“ z Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) a to prostřednictvím ocasní žíly v dávce 1 U/kg. Jako kontrola byl potkanům z kontrolní skupiny aplikován ocasní žilou PBS v dávce 1 ml/myš. Toto je na obr. 5 a obr. 6.

Jak je patrné z výsledků, myší monoklonální protilátka a polidštěná protilátka rychle snižovaly hladiny ionizovaného vápníku v krvi hyperkalcinemických modelových zvířat (obr. 1, 3 a 5). Protilátky vykazovaly rychlý nástup účinku a dlouhé trvání účinku, ačkoliv účinek preparátu kalcitoninu byl dočasný. U skupin, kterým byla podávána protilátka, byla návratnost tělesné hmotnosti pozorována 24 h po podání, což nebylo pozorováno u skupiny, které byl podáván preparát kalcitoninu (obr. 2, 4 a 6). Tyto výsledky jasně ukazují, že myší monoklonální protilátka nebo polidštěná protilátka, které vykazují neutralizační aktivitu proti PTHrP, jsou užitečné jakožto terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem, která musí být neodkladně léčena.

Příklad 2 Příprava hybridomů, které produkují myší monoklonální protilátku proti PTHrP (1 až 34)

Hybridomy, které jsou schopny produkovat monoklonální protilátku proti lidskému PTHrP (1 až 34) # 23-57-154 a # 23-57-137-1, byly připraveny následujícím způsobem (Sato, K. a kol., J. Bone Miner. Res. 8, 849 až 860, 1993). Aminokyselinová sekvence lidského PTHrP je uvedena v SEQ ID NO:75.

Jako imunogen byl použit PTHrP (1 až 34) (Peninsula), na který byl konjugován přes karbodiimid (Dojinn) nosičový protein thyroglobulin. Konjugát thyroglobulin-PTHrP (1 až 34) byl dialyzován s cílem získat roztok, který bude obsahovat proteiny v koncentraci 2 µg/ml. Výsledný roztok byl smíchán s Freundovým adjuvants (Difco) v poměru 1:1 a vznikla emulze. Tato emulze byla injekčně aplikována 16 samicím BALB/C myši a to 11x podkožně do hřbetu nebo intraperitonálně v jednotlivé dávce 100 µg/myš. Tímto způsobem byla myš imunizována. Pro první imunizaci bylo použito Freundovo kompletní adjuvants, zatímco pro další imunizace Freundovo nekompletní adjuvants.

U každé imunizované myši byl následujícím způsobem stanoven titr protilátek v séru. Každá myš byla přes ocasní žílu vykrvena a bylo odděleno antisérum od krve. Antisérum bylo naředěno RIA pufrem a smícháno s PTHrP (1 až 34), značeným ¹²⁵I. Cílem bylo stanovit vazebnou aktivitu. Myším, u nichž byl zjištěn dostatečně zvýšený titr, byl injekcí aplikován

intraperitonálně PTHrP (1 až 34) bez nosičového proteinu v dávce 50 µg/myš. Toto bylo považováno za poslední imunizaci.

Tři dny po poslední imunizaci byla myš usmrcena a byla ji odebrána slezina. Buňky sleziny byly podrobeny buněčné fúzi s myšími myelomovými buňkami P3x63Ag8U.1, což bylo provedeno známým postupem s použitím 50% polyethylenglykolu 4000. Takto připravené fúzované buňky byly umístěny v koncentraci 2×10^4 /jamku do každé z 85 jamek destičky s 96 jamkami. Hybridomy byly testovány v médiu HAT následujícím postupem.

Testování hybridomů bylo provedeno prostřednictvím stanovení přítomnosti protilátek rozpoznávajících PTHrP v supernatantu kultury v jamkách, ve kterých byl v HAT médiu pozorován růst buněk. Stanovení bylo provedeno heterogenní RIA. Byly vybrány hybridomy z těch jamek, ve kterých byla potvrzena vazebná schopnost pro protilátky, rozpoznávající PTHrP. Takto získané hybridomy byly suspendovány do média RPMI-1640, které obsahovalo 15% FCS doplněný OPI (Sigma). Poté následovala unifikace hybridomů limitovaným ředěním. Takto byly získány 2 typy hybridomových klonů, #23-57-154 a #23-57-137-1, přičemž oba vykazovaly vysokou vazebnou afinitu k PTHrP (1 až 34).

Hybridomový klon #23-57-137-1 byl označen „myš-myš hybridom #23-57-137-1“ a byl 15. srpna 1996 uložen v souladu s Budapešťskou dohodou v National Institute of Bioscience and Human-technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japonsko (1 až 3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko) pod přístupovým číslem FERM BP-5631.

Příklad 3 Klonování DNA kódující V-oblast myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP (1 až 34)

Klonování DNA kódující V-oblast myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP (1 až 34) #23-57-137-1 bylo provedeno následujícím způsobem.

(1) Příprava mRNA

mRNA byla z hybridomu #23-57-137-1 připravena pomocí soupravy Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech). To znamená, že buňky hybridomu #23-57-137-1 byly zcela homogenizovány v extrakčním pufru a byla izolována mRNA, která byla dále v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy, přečištěna na koloně oligo(dT)-Cellulose Spun Column. Výsledný roztok byl podroben ethanolovému srážení s cílem získat mRNA ve formě precipitátu. Sraženina mRNA byla rozpuštěna v elučním pufru.

(2) Produkce a amplifikace cDNA pro gen kódující V-oblast myšního H-řetězce

(i) Klonování cDNA pro V-oblast H-řetězce protilátky #23-57-137-1

Gen kódující V-oblast H-řetězce myši monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP, byl klonován 5'-RACE postupem (Frohman, M. A. *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 až 9002, 1988; Belyavsky, A. *a kol.*, Nucleic Acids Res. 17, 2919 až 2932, 1989). Tento postup byl proveden pomocí soupravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONETECH) a to v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. V tomto postupu byl primerem, použitým pro syntézu cDNA, MHC2 primer (SEQ ID NO:1), který je schopen hybridizovat s C-oblastí myšního H-řetězce. Výše připravená mRNA (asi 2 µg), která sloužila jako matrice pro syntézu cDNA, byla smíchána s MHC2 primerem (10 pmol). Výsledná směs byla podrobena reakci s reverzní transkriptázou. Aby byl zvýšen účinek reverzní transkripce mRNA do cDNA, probíhala reakce při teplotě 52 °C po dobu 30 min.

Do výsledného reakčního roztoku byl přidán 6 N NaOH, aby byla zhydrolyzována veškerá zbývající RNA (při 65 °C po dobu 30 min.). Roztok byl poté podroben ethanolovému srážení, jehož cílem bylo izolovat a přechistit cDNA ve formě precipitátu. Purifikovaná cDNA byla ligována k primeru Ampli FINDER Anchor (SEQ ID NO:42) na 5' konci a to tak, že reakce s T4 RNA ligázou byla provedena při teplotě 37 °C 6 h a dále 16 h při laboratorní teplotě. Jako primery pro amplifikaci cDNA pomocí PCR byly použity primer Anchor (SEQ ID NO:2) a primer MHC-G1 (SEQ ID NO:3) (S.T. Jones, *a kol.*, Biotechnology 9, 88, 1991).

Roztok pro PCR obsahoval (na 50 µl) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 jednotek TaKaRa Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), 10 pmol primeru Anchor a 1 µl reakční směsi cDNA, do které byly ligovány primer MHC-G1 a primer Ampli FINDER Anchor. Toto vše bylo převrstveno minerálním olejem (50 µl). PCR bylo prováděno v zařízení Thermal Cycler Model 480J (Perkin Elmer) ve 30 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 45 s; 60 °C po dobu 45 s a 72 °C po dobu 2 min.

(ii) Klonování cDNA pro V-oblast L-řetězce protilátky #23-57-137-1

Gen kódující V-oblast L-řetězce myši monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP byl klonován postupem 5'-RACE (Frohman, M. A. *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 až 9002, 1988; Belyavsky, A. *a kol.*, Nucleic Acids Res. 17, 2919 až 2932, 1989). Tento postup byl proveden pomocí soupravy 5'-Ampli Finder RACE Kit (Clonetech) v souladu s pokyny, které

jsou součástí soupravy. V tomto postupu byl jako primer pro syntézu cDNA použit oligo-dT primer. Výše připravená mRNA (asi 2 µg), která sloužila jako matrice pro syntézu cDNA, byla smíchána s oligo-dT primerem. Výsledná směs byla podrobena reakci s reverzní transkriptázou při teplotě 52 °C po dobu 30 min., za účelem zvýšení účinku reverzní transkripce mRNA do cDNA. Do výsledného reakčního roztoku byl přidán 6 N NaOH, aby byla zhydrolyzována veškerá zbývající RNA (při 65 °C po dobu 30 min.). Výsledný roztok byl podroben ethanolovému srážení, jehož cílem bylo izolovat a přechistit cDNA ve formě precipitátu. Takto syntetizovaná cDNA byla ligována k Ampli FINDER Anchor na 5' konci a to tak, že reakce s T4 RNA ligázou byla provedena při teplotě 37 °C 6 h a dále 16 h při laboratorní teplotě.

Primer pro PCR MLC (SEQ ID NO:4) byl navržen na základě konzervativní sekvence C-oblasti λ řetězce myšího L-řetězce a poté byl syntetizován v zařízení 394 DNA/RNA Synthetizer (ABI). Roztok pro PCR obsahoval (na 100 µl) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 jednotek AmpliTaq (Perkin Elmer), 50 pmol primeru Anchor (SEQ ID NO:2) a 1 µl reakční směsi cDNA, do které byly ligovány MLC (SEQ ID NO:4) a Ampli FINDER Anchor. Toto vše bylo převrstveno minerálním olejem (50 µl). PCR bylo prováděno v zařízení Thermal Cycler Model 480J (Perkin Elmer) ve 35 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 45 s; 60 °C po dobu 45 s a 72 °C po dobu 2 min.

(3) Přechištění a fragmentace produktů PCR

Každý z DNA fragmentů, amplifikovaných PCR (popsáno výše), byl separován elektroforézou v agarózovém gelu v 3% Nu Sieve GTG agaróze (FMC Bio. Products). Pro každou V-oblast H-řetězce a V-oblast L-řetězce byl vyříznut proužek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti asi 550 bp. Každý z těchto kousků gelu, který obsahoval sledovaný fragment DNA, byl podroben přechištění pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (Bio101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Přechištěná DNA byla srážena ethanolem a sraženina DNA byla rozpuštěna ve 20 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Část (1 µl) roztoku DNA byla naštěpena restriční enzymem XmaI (New England Biolabs) při teplotě 37 °C po dobu 1 h a dále restriční enzymem EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při 37 °C 1 h. Roztok po štěpení byl extrahován fenolem a chloroformem, poté byl srážen ethanolem a jako výsledek byla získána DNA.

Tímto způsobem byly získány dva fragmenty DNA, které obsahovaly gen kódující V-oblast myšního H-řetězce a gen kódující V-oblast myšního L-řetězce. Oba fragmenty měly sekvenci pro rozpoznání EcoRI na 5' konci a sekvenci pro rozpoznání XmaI na 3' konci.

Fragmenty DNA získané štěpením EcoRI a XmaI, které obsahovaly gen kódující V-oblast myšního H-řetězce a gen kódující V-oblast myšního L-řetězce, byly jednotlivě zaligovány do vektoru pUC19, který byl pomocí soupravy DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy, naštěpen při teplotě 16 °C 1 h enzymy EcoRI a XmaI. Část (10 µl) ligační směsi byla přidána ke 100 µl roztoku, který obsahoval kompetentní buňky *E. coli* JM 109 (Nippon Gene Co., Ltd.). Směs buněk byla ponechána stát 15 min. v ledu, 1 min. při teplotě 42 °C a 1 min. v ledu. Výsledná směs buněk byla přidána ke 300 µl SOC média (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a poté byla inkubována 30 min. při 37 °C. Výsledný roztok buněk byl rozetřen na LB agar nebo na 2xYT agar (Molecular Cloning: A Laboratory Manual Sambrook, *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) obsahující buď 100 nebo 50 µg/ml ampicilinu, 0,1 mM IPTG a 20 µg/ml X-gal a poté byl inkubován při 37 °C přes noc. Tímto způsobem byly připraveny transformanty *E. coli*.

Transformanty byly kultivovány přes noc při teplotě 37 °C ve 2 ml LB média nebo 2xYT média obsahujícího buď 100 nebo 50 µg/ml ampicilinu. Buněčná frakce byla aplikována do zařízení Plasmid Extracter PI-100Σ (Kurabo Industries, ltd.) nebo byla použita souprava QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Výsledkem byla plasmidová DNA. Takto získaná plasmidová DNA byla sekvenována.

(4) Sekvenování genu kódujícího V-oblast myší protilátky

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblast, kterou nese plasmid, byla stanovena v zařízení DNA Sequencer 373A (ABI; Perkin-Elmer) pomocí Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Při sekvenování byly použity primery M13 Primer M4 (Takara Shuzo Co., Ltd.) (SEQ ID NO:5) a M13 Primer RV (Takara Shuzo Co., Ltd.) (SEQ ID NO:6). Nukleotidová sekvence byla potvrzena v obou směrech.

Plasmid obsahující gen kódující V-oblast myšního H-řetězce, který pochází z hybridomu #23-57-137-1, byl označen „MBC1H04“ a plasmid obsahující gen kódující V-oblast myšního L-řetězce, který pochází z hybridomu #23-57-137-1, byl označen „MBC1L24“. Nukleotidové sekvence (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) DNA kódující V-oblast H-řetězce pocházejícího z protilátky #23-57-137-1 v plasmidu MBC1H04 a gen kódující V-oblast

L-řetězce odvozeného od myší protilátky #23-57-137-1 v plasmidu MBC1H24 jsou ukázány v SEQ ID NO:57 a 65. Aminokyselinové sekvence polypeptidů pro V-oblast H-řetězce a V-oblast L-řetězce jsou ukázány v SEQ ID NO:46 a 45.

Kmen *E. coli* obsahující plasmid MBC1H04 a kmen *E. coli* obsahující plasmid MBC1L24 byly označeny „*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04“ a „*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24)“. Tyto kmeny *E. coli* byly uloženy 15. srpna 1996 za podmínek Budapešťské dohody v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japonsko (1 až 3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko) pod přístupovým číslem FERM BP-5628 v případě *Escherichia coli* JM109 (MBC1H04) a FERM BP-5627 v případě *Escherichia coli* JM109 (MBC1L24).

(5) Stanovení CDR myší monoklonální protilátky #23-57-137-1 proti lidskému PTHrP

V-oblast H-řetězce a V-oblast L-řetězce mají obecně podobné struktury, v nichž jsou obsaženy 4 oblasti základní struktury (FR) spojené přes 3 hypervariabilní oblasti (tj. oblasti určující komplementaritu; CDR). Aminokyselinové sekvence FR oblastí jsou relativně velmi konzervativní, zatímco aminokyselinové sekvence CDR oblastí mají extrémně vysokou variabilitu (Kabat, E.A. *a kol.*, „Sequence of Proteins of Immunological Interest“, US Dept. Health and Human Services, 1983).

S ohledem na tato fakta byla s odkazem na databázi aminokyselinových sekvencí pro protilátky, která byla vytvořena Kabatem *a kol.*, stanovena homologie aminokyselin mezi V-oblastmi myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP. CDR oblasti V-oblastí byly tedy určeny a jsou ukázány v tab. 1.

Aminokyselinové sekvence pro CDR oblasti 1 až 3 ve V-oblasti L-řetězce jsou ukázané v SEQ ID NO:59 až 61 a aminokyselinové sekvence CDR 1 až 3 ve V-oblasti H-řetězce jsou ukázány v SEQ ID NO:62 až 64.

Tabulka 1

V-oblast	SEQ ID NO:	CDR1	CDR2	CDR3
V-oblast H-řetězce	57	31 - 35	50 – 66	99 - 107
V-oblast L-řetězce	65	23 - 34	50 – 60	93 - 105

Příklad 3 Konstrukce chimerické protilátky

(1) Konstrukce H-řetězce chimerické protilátky

(i) Konstrukce V-oblasti H-řetězce

Aby byla klonovaná DNA kódující V-oblast myšího H-řetězce ligována do expresního vektoru nesoucího genomickou DNA C-oblasti Cy1 lidského H-řetězce, byla pomocí PCR modifikována. Protisměrný primer MBC1-S1 (SEQ ID NO:7) byl navržen tak, aby hybridizoval s DNA sekvencí kódující 5' oblast vedoucí sekvence pro V-oblast a aby měl Kozakovu sekvenci (Kozak, M. *a kol.*, J. Mol. Biol., 196, 947 až 950, 1987) i místo pro rozpoznání Hind III. Primer MBC1-a, směřující po směru, (SEQ ID NO:8) byl navržen tak, aby hybridizoval s DNA sekvencí kódující 3' oblast J-oblasti a aby měl sekvenci sestříhu donoru i sekvenci pro rozpoznání BamHI. PCR bylo provedeno pomocí TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pufru. Roztok pro PCR obsahoval (na 50 µl) 0,07 µg plasmidu MBC1H04 jakožto matricové DNA, 50 pmol MBC1-a a 50 pmol MBC1-S1 jakožto primerů, 2,5 U TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufru. Přes toto bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR probíhalo ve 30 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 1 min.; 55 °C po dobu 1 min. a 72 °C po dobu 2 min. Takto pomocí PCR amplifikované DNA fragmenty byly separovány elektroforézou v agarózovém gelu v 3% Nu Sieve GTG Agarose (FMC Bio. Products).

Kousek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti 437 bp, byl vyříznut a fragment DNA byl poté přečištěn pomocí GENECLAN II Kit (BIO 101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Přečištěná DNA shromážděná pomocí ethanolového srážení byla rozpuštěna ve 20 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Část (1 µl) výsledného roztoku DNA byla naštěpena restrikcčními enzymy BamHI a HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C a po dobu 1 h. Roztok po štěpení byl extrahován fenolem a chloroformem a poté byla sledovaná DNA vysrážena ethanolem.

Získaný DNA fragment po štěpení HindIII a BamHI, který obsahoval gen kódující V-oblast myšího H-řetězce, byl subklonován do vektoru pUC19, který byl rovněž naštěpen HindIII a BamHI. Výsledný plasmid byl sekvenován na zařízení DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) pomocí primerů M13 Primer M4 a M13 Primer RV a soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Byl získán plasmid nesoucí gen o správné nukleotidové sekvenci kódující V-oblast myšího H-řetězce, který pochází z hybridomu #23-57-137-1 a který

má sekvenci pro rozpoznání HindIII a Kozakovu sekvenci na svém 5' konci a místo pro rozpoznání BamHI na svém 3' konci. Tento plasmid byl označen „MBC1H/pUC19“.

(ii) Konstrukce V-oblasti H-řetězce pro cDNA typu myšího-lidského chimerického H-řetězce

Aby byla DNA kódující V-oblast myšího H-řetězce, která byla konstruována postupem, který je uveden výše, ligována k cDNA C-oblasti Cy1 lidského H-řetězce, byla pomocí PCR modifikována. Protisměrný primer MBC1HVS2 (SEQ ID NO:9) pro V-oblast H-řetězce byl navržen tak, aby došlo k nahrazení druhé aminokyseliny (asparagin) sekvence kódující přední část vedoucí sekvence pro V-oblast H-řetězce glycinem a aby měl Kozakovu sekvenci (Kozak, M. *a kol.*, J. Mol. Biol., 196, 947 až 950, 1987) i místo pro rozpoznání Hind III a místo pro rozpoznání EcoRI. Primer MBC1HVR2, směřující po směru, (SEQ ID NO:10) pro V-oblast H-řetězce byl navržen tak, aby hybridizoval se sekvencí DNA kódující 3'oblast J-oblasti, aby kódoval 5'oblast C-oblasti a aby měl sekvence pro rozpoznání ApaI a SmaI.

PCR bylo provedeno pomocí TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pufru. Roztok pro PCR obsahoval (na 50 µl) 0,6 µg plasmidu MBC1H/pUC19 jako matricovou DNA, 50 pmol MBC1HVS2 a 50 pmol MBC1HVR2 jakožto primery, 2,5 U TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufru. Přes toto bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR probíhalo ve 30 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 1 min.; 55 °C po dobu 1 min. a 72 °C po dobu 1 min. DNA fragmenty amplifikované pomocí PCR byly separovány elektroforézou v agarózovém gelu na 1% Sea Kem GTG Agarose (FMC Bio. Products). Poté byl kousek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti 456 bp, vyříznut a tento fragment DNA byl přečištěn pomocí GENE CLEAN II Kit (BIO101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Přečištěná DNA byla srážena ethanolem a poté byla rozpuštěna ve 20 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Výsledný roztok DNA (1 µg) byl naštěpen restrikcčními enzymy EcoRI a SmaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C a po dobu 1 h. Roztok po štěpení byl extrahován fenolem a chloroformem a poté byla sledovaná DNA vysrážena ethanolem. Získaný DNA fragment po štěpení EcoRI a SmaI, který obsahoval gen kódující V-oblast myšího H-řetězce, byl subklonován do vektoru pUC19, který byl naštěpen enzymy EcoRI a SmaI. Výsledný plasmid byl sekvenován na zařízení DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) pomocí primerů M13 Primer M4 a M13 Primer RV a soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Byl získán plasmid, který obsahoval gen kódující V-oblast myšího H-řetězce pocházející z hybridomu #23-57-137-1, který měl správnou nukleotidovou sekvenci, sekvence pro rozpoznání EcoRI a

HindIII a Kozakovu sekvenci na svém 5' konci a sekvence pro rozpoznání ApaI a SmaI na svém 3' konci. Tento plasmid byl označen „MBC1Hv/pUC19“.

(iii) Konstrukce expresního vektoru pro H-řetězec chimerické protilátky

cDNA obsahující DNA pro C-oblast Cy1 H-řetězce lidské protilátky byla připravena následujícím postupem. Z CHO buňky, do které byly vloženy expresní vektor DHFR-ΔE-RVh-PM1-f (viz WO 92/19759) kódující genomické DNA V-oblasti H-řetězce polidštěné protilátky PM1 a C-oblasti H-řetězce IgG1 lidské protilátky (N. Takahashi *a kol.*, Cell 29, 671 až 679, 1982) a expresní vektor RV1-PM1a (viz WO 92/19759) kódující genomické DNA V-oblasti L-řetězce polidštěné protilátky PM1 a C-oblasti κ řetězce L-řetězce lidské protilátky, byla připravena mRNA. Použitím mRNA, byla metodou RT-PCR klonována cDNA obsahující V-oblast H-řetězce polidštěné protilátky PM1 a C-oblast Cy1 lidské protilátky a poté byla subklonována do plasmidu pUC19 do místa HindIII-BamHI. Po sekvenování byl získán plasmid, který měl správnou nukleotidovou sekvenci a který byl označen „pRVh-PM1f-cDNA“.

Pro konstruování expresního vektoru pro cDNA obsahující gen pro V-oblast H-řetězce polidštěné protilátky PM1 a gen pro C-oblast Cy1 lidské protilátky byl připraven expresní vektor DHFR-ΔE-RVh-PM1-f, ve kterém byly deletovány HindIII místo mezi SV40 promotorem a DHFR genem i EcoRI místo mezi EF-1 α promotorem a genem pro V-oblast H-řetězce polidštěné protilátky PM1.

Získaný plasmid (pRVh-PM1f-cDNA) byl naštěpen BamHI, konce byly ztupeny Klenowovým fragmentem a dále byl naštěpen HindIII, čímž byl získán fragment HindIII-BamHI s tupými konci. Tento fragment byl ligován do výše zmíněného expresního vektoru DHFR-ΔE-RVh-PM1-f s deletovaným HindIII místem a EcoRI místem, který byl naštěpen HindIII a BamHI. Tím byl zkonstruován expresní vektor RVh-PM1f-cDNA, který obsahoval cDNA kódující V-oblast H-řetězce polidštěné protilátky PM1 a C-oblast Cy1 lidské protilátky.

Expresní vektor RVh-PM1f-cDNA obsahující cDNA kódující V-oblast H-řetězce polidštěné protilátky PM1 a C-oblast Cy1 lidské protilátky byl naštěpen ApaI a BamHI. Z něj byl získán DNA fragment obsahující C-oblast H-řetězce. Výsledný DNA fragment byl začleněn do výše uvedeného plasmidu MBC1Hv/pUC19, který byl naštěpen ApaI a BamHI. Takto připravený plasmid byl označen „MBC1HcDNA/pUC19“. Tento plasmid obsahoval cDNA kódující V-oblast H-řetězce myši protilátky a C-oblast Cy1 lidské protilátky a měl sekvence pro rozpoznání HindIII a EcoRI na svém 5' konci a sekvence pro rozpoznání BamHI na svém 3' konci.

Plasmid MBC1HcDNA/pUC19 byl naštěpen EcoRI a BamHI za vzniku DNA fragmentu, který obsahoval nukleotidovou sekvenci kódující H-řetězec chimerické protilátky. Výsledný DNA fragment byl začleněn do expresního vektoru pCOS1, který byl naštěpen EcoRI a BamHI. Tímto byl získán expresní vektor pro chimerickou protilátku, který byl označen „MBC1HcDNA/pCOS1“. Expresní vektor pCOS1 byl zde konstruován pomocí HEF-PMh-gy1 (viz WO 92/19759) vyštěpením genů pro protilátku prostřednictvím štěpení EcoRI a SmaI a poté jeho zaligováním do EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (Takara Shuzo Co., Ltd.).

Pro přípravu plasmidu pro expresi v CHO buňce byl plasmid MBC1HcDNA/pUC19 naštěpen EcoRI a BamHI, čímž byl získán DNA fragment obsahující gen pro H-řetězec chimerické protilátky. DNA fragment byl poté začleněn do expresního plasmidu pCHO1, který byl naštěpen EcoRI a BamHI. Výsledkem byl expresní plasmid pro chimerickou protilátku, který byl označen „MBC1HcDNA/pCHO1“. Expresní vektor pCHO1 byl zde konstruován pomocí DHFR-ΔE-rvH-PM1-f (viz WO 92/19759) vyštěpením genu pro protilátku pomocí EcoRI a SmaI a poté zaligováním do EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (Takara Shuzo, Co., Ltd.).

(2) Konstrukce C-oblasti lidského L-řetězce

(i) Příprava klonovacího vektoru

Pro konstrukci vektoru pUC19 obsahujícího gen pro C-oblast lidského L-řetězce, byl připraven vektor pUC19 s deletovaným HindIII místem. Vektor pUC19 (2 µg) byl naštěpen ve 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 U HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Výsledný roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a poté byl podroben ethanolovému srážení s cílem získat požadovanou DNA.

Získaná DNA byla podrobena reakci v 50 µl reakčního roztoku obsahujícího 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 0,5 mM dNTP a 6 U Klenowova fragmentu (Gibco BRL). Reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 20 min. Tímto způsobem byly ztupeny terminální konce DNA. Tato reakční směs byla extrahována fenolem a chloroformem a poté byla podrobena ethanolovému srážení, jehož cílem bylo získat vektorovou DNA.

Takto získaná vektorová DNA byla podrobena reakci v reakčním roztoku o objemu 10 µl, který obsahoval 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 obj.% polyethylenglykol-8000 a 0,5 U T4 DNA ligázy (Gibco BRL). Reakce probíhala při teplotě

16 °C po dobu 2 h. Cílem byla samoligace vektorové DNA. Reakční roztok (5 µl) byl přidán ke 100 µl roztoku, který obsahoval kompetentní buňky *E. coli*, JM109 (Nippon Gene Co., Ltd.) a výsledný roztok byl ponechán stát 30 min. v ledu, 1 min. při teplotě 42 °C a opět 1 min. v ledu. K reakčnímu roztoku bylo přidáno kultivační médium SOC (500 µl) a byla provedena 1 h inkubace při teplotě 37 °C. Výsledný roztok byl rozetřen na agarové médium 2xYT (obsahující 50 µg/ml ampicilinu), na jehož povrch byly aplikovány X-gal a IPTG (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Misky byly kultivovány při teplotě 37 °C přes noc, čímž byl získán transformant.

Transformant byl kultivován v médiu 2xYT (20 ml) obsahujícím ampicilin (50 µg/ml) při 37 °C přes noc. Z buněk kultivačního média byla izolována plasmidová DNA, která byla přečištěna pomocí soupravy Plasmid Mini Kit (QIAGEN) v souladu s pokyny, které byly součástí soupravy. Přečištěný plasmid byl naštěpen HindIII. Plasmid, u kterého bylo potvrzeno, že má deletované HindIII místo, byl označen jako „pUC19ΔHindIII“.

(ii) Konstrukce DNA kódující C-oblast λ řetězce lidského L-řetězce

U C-oblasti λ řetězce L-řetězce lidské protilátky je známo, že má alespoň 4 izotypy včetně $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^-$, $\text{Mcg}^-\text{Ke}^-\text{Oz}^-$, $\text{Mcg}^-\text{Ke}^-\text{Oz}^+$ a $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^-$ (P. Dariavach, *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074 až 9078, 1987). V databázi EMBL byl proveden výběr C-oblasti λ řetězce L-řetězce lidské protilátky, která je homologní s C-oblastí λ řetězce L-řetězce myši protilátky #23-57-137-1. Výsledkem bylo zjištění, že nejvyšší stupeň homologie s C-oblastí λ řetězce L-řetězce myši #23-57-137-1 vykazoval $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^-$ izotyp λ řetězce L-řetězce lidské protilátky (přístupové číslo X57819) (P. Dariavach, *a kol.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074 až 9078, 1987) a to 64,4% homologii aminokyselinové sekvence a 73,4% homologii nukleotidové sekvence.

Gen kódující C-oblast λ řetězce L-řetězce lidské protilátky byl konstruován pomocí PCR. Primer pro PCR byl syntetizován pomocí zařízení 394 DNA/RNA Synthesizer (ABI). Syntetizované primery byly následující: HLAMB1 (SEQ ID NO:11) a HLAMB3 (SEQ ID NO:13), přičemž oba měly templátovou DNA sekvenci a HLAMB2 (SEQ ID NO:12) a HLAMB4 (SEQ ID NO:14), přičemž oba měly netemplátovou DNA sekvenci; každý primer obsahoval na obou terminálních koncích komplementární sekvenci 20 až 23 bp.

Vnější primery HLAMBS (SEQ ID NO:15) a HLAMBR (SEQ ID NO:16) měly sekvence homologní s primery HLAMB1 a HLAMB4. HLAMBS obsahoval sekvence pro rozpoznání

EcoRI, HindIII a BlnI a HLAMBR obsahoval sekvenci pro rozpoznání EcoRI. V prvním PCR byly provedeny reakce mezi HLAMB1 a HLAMB2 a mezi HLAMB3 a HLAMB4. Po ukončení reakcí byly oba výsledné produkty PCR smíchány v ekvivalentních množstvích a poté byly kompletovány v následujícím druhém PCR. K reakčnímu roztoku byly přidány vnější primery HLAMBS a HLAMBR. Tato reakční směs byla podrobena třetímu PCR, jehož cílem bylo amplifikovat DNA o celé délce.

Každé PCR bylo provedeno pomocí TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. V prvním PCR bylo použito 100 μ l reakčního roztoku obsahujícího 5 pmol HLAMB1, 0,5 pmol HLAMB2 a 5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) nebo reakčního roztoku obsahujícího 5 pmol HLAMB3, 5 pmol HLAMB4 a 5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Toto vše bylo převrstveno 50 μ l minerálního oleje. PCR probíhalo v 5 cyklech za těchto podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

V druhém PCR byla použita směs obou reakčních roztoků (50 μ l každého), která byla převrstvena 50 μ l minerálního oleje. Proběhly 3 cykly PCR za těchto podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

Ve třetím PCR byl použit reakční roztok, do kterého byly přidány vnější primery HLAMBS a HLAMBR (50 pmol každého). PCR proběhlo ve 30 cyklech za následujících podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

Fragment DNA získaný třetím PCR byl podroben elektroforéze v 3% agarózovém gelu (NuSieve GTG Agarose, FMC) a poté byl z gelu separován a přečištěn pomocí GENECLAN II Kit (BIO101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy.

Získaný DNA fragment byl naštěpen v reakčním roztoku (20 μ l), který obsahoval 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, a 8 U EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Tento reakční roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a DNA z něj byla získána ethanolovým srážením. DNA byla rozpuštěna v roztoku (8 μ l) obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plasmid pUC19 Δ HindIII (0,8 μ g), který byl připraven výše uvedeným postupem, byl naštěpen stejným postupem, jako je uvedeno výše, enzymem EcoRI. Roztok po štěpení byl podroben extrakci fenolem/chloroformem a poté bylo provedeno ethanolové srážení, čímž byl získán naštěpený plasmid pUC19 Δ HindIII. Naštěpený plasmid byl podroben reakci v roztoku (50 μ l), který obsahoval 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM MgCl₂ a alkalickou fosfatázu (*E. coli* C75; Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 30 min.. Cílem tohoto kroku bylo defosforylovat (tzn. ošetřit BAP) plasmid. Reakční roztok byl podroben extrakci

fenolem/chloroformem a DNA z něj byla získána ethanolovým srážením. Takto získaná DNA byla rozpuštěna v roztoku (10 µl) obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plasmid pUC19ΔHindIII (1 µl), ošetřený BAP, byl ligován do výše zmíněných PCR produktů (4 µl) pomocí soupravy DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný plasmid byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli*, JM109 a výsledkem byl transformant. Transformant byl kultivován přes noc v médiu 2xYT (2 ml) obsahujícím ampicilin o koncentraci 50 µl/ml. Plasmid byl z buněčné frakce izolován pomocí QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

U získaného plasmidu byla sekvenována klonovaná část DNA. Sekvenování bylo uskutečněno v sekvenátoru 373A DNA Sequencer (ABI) pomocí M13 Primer M4 a M13 Primer RV (Takara Shuzo Co., Ltd.) Výsledkem bylo zjištění, že klonovaná DNA obsahovala delecí o velikosti 12 bp. Plasmid byl označen „CλΔ/pUC19“. Poté byly pro vytvoření deletované části nově syntetizovány primery HCLMS (SEQ ID NO:17) a HCLMR (SEQ ID NO:18) a pomocí těchto primerů byla PCR postupem rekonstruována správná DNA.

V prvním PCR byl jako matrice použit plasmid CλΔ/pUC19 s DNA delecí a reakce byla provedena s každou sadou primerů HLAMBS a HCLMS a HCLMS a HLAMB4. Produkty PCR byly přečištěny odděleně. Ve druhém PCR byly produkty sestaveny dohromady. Ve třetím PCR byly k reakčnímu produktu druhého PCR přidány vnější primery HLAMBS a HLAMB4 a produkt byl amplifikován s cílem získat celou DNA.

V prvním PCR byl použit reakční roztok (100 µl) obsahující 0,1 µg CλΔ/pUC19 jako matrici, buď 50 pmol každého primeru HLAMBS a HCLMR nebo 50 pmol každého primeru HCLMS a HLAMB4 a 5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Toto bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR probíhalo ve 30 cyklech za těchto podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

Produkty prvního PCR, HLAMBS-HCLMR (236 bp) a HCLMS-HLAMB4 (147 bp), byly jednotlivě podrobeny elektroforéze v 3% agarózovém gelu s cílem izolovat DNA fragmenty. DNA fragmenty byly shromážděny a z gelu byly přečištěny pomocí GENECLAN II Kit (BIO101). Ve druhém PCR bylo použito 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 40 ng každého přečištěného DNA fragmentu a 1 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Přes toto bylo převrstveno 25 µl minerálního oleje. Proběhlo 5 cyklů PCR za těchto podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

Ve třetím PCR byl použit reakční roztok o objemu 100 µl obsahující 2 µl reakčního roztoku získaného ve druhém PCR, 50 pmol každého vnějšího primeru HLAMBS a HLAMB4 a 5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Přes toto bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR proběhlo ve 30 cyklech za následujících podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a

72 °C 1 min. Tímto byl získán DNA fragment o velikosti 357 bp (produkt třetího PCR). DNA fragment byl podroben elektroforéze v 3% agarózovém gelu, aby mohl být izolován DNA fragment. Výsledný DNA fragment byl získán a přečištěn pomocí soupravy GENECLAN Kit (BIO101).

Část (0,1 µg) takto získaného DNA fragmentu byla naštěpena EcoRI a poté subklonována do plasmidu pUC19ΔHindIII, který byl ošetřen BAP. Výsledný plasmid byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován přes noc v médiu 2xYT (2 ml) obsahujícím ampicilin o koncentraci 50 µl/ml. Plasmid byl z buněčné frakce izolován a přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Přečištěný plasmid byl sekvenován v sekvenátoru 373A DNA Sequencer (ABI) pomocí M13 Primer M4 a M13 Primer RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Plasmid, u kterého byla potvrzena správná nukleotidová sekvence bez jakékoliv delece, byl označen jako „Cλ/pUC19“.

(iii) Konstrukce genu kódujícího C-oblast κ řetězce lidského L-řetězce

DNA fragment kódující C-oblast κ řetězce L-řetězce byl klonován z plasmidu HEF-PM1k-gk (WO 92/19759) pomocí PCR. Primer HKAPS, směřující po směru, (SEQ ID NO:19) byl navržen tak, aby obsahoval EcoRI, HindIII a BlnI rozpoznávací sekvence a zpětný primer HKAPA (SEQ ID NO:20) byl navržen tak, aby obsahoval rozpoznávací sekvenci pro EcoRI.

PCR bylo provedeno pomocí 100 µl reakčního roztoku obsahujícího 0,1 µg plasmidu HEF-PM1k-gk jako matrici, 50 pmol každého primeru HKAPS a HKAPA a 5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Přes toto bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR proběhlo ve 30 cyklech za následujících podmínek: 94 °C 1 min., 60 °C 1 min. a 72 °C 1 min. Tím byl získán produkt PCR o velikosti 360 bp. DNA fragment byl izolován a přečištěn elektroforézou v 3% agarózovém gelu a poté byl shromážděn a přečištěn pomocí soupravy GENECLANII Kit (BIO101).

Takto získaný DNA fragment byl naštěpen EcoRI a poté byl klonován do plasmidu pUC19ΔHindIII, který byl ošetřen BAP. Výsledný plasmid byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován přes noc v médiu 2xYT (2 ml) obsahujícím ampicilin o koncentraci 50 µl/ml. Plasmid byl z buněčné frakce přečištěn pomocí QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Přečištěný plasmid byl sekvenován v sekvenátoru 373A DNA Sequencer (ABI) pomocí M13 Primer M4 a M13 Primer RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Plasmid, u kterého byla potvrzena správná nukleotidová sekvence, byl označen „Cκ/pUC19“.

(3) Konstrukce expresního vektoru pro L-řetězec chimerické protilátky

Byl sestaven expresní vektor pro L-řetězec chimerické protilátky #23-57-137-1. Gen kódující V-oblast L-řetězce protilátky #23-57-137-1 byl ligován do místa HindIII-BlnI (umístěného bezprostředně před C-oblastí lidské protilátky) plasmidu Cλ/pUC19 a Cκ/pUC19. Tímto byly získány vektory pUC19, které obsahují DNA kódující V-oblast L-řetězce chimerické protilátky #23-57-137-1 a buď C-oblast λ řetězce L-řetězce nebo C-oblast κ oblasti L-řetězce. Každý ze vzniklých plasmidů byl poté naštěpen EcoRI s cílem separovat gen pro L-řetězec chimerické protilátky. Gen byl subklonován do HEF expresního vektoru.

To znamená, že z plasmidu MBC1L24 byl pomocí PCR klonován DNA fragment kódující V-oblast L-řetězce protilátky #23-57-137-1. Primery, použité v PCR, byly jednotlivě syntetizovány pomocí 394 DNA/RNA Synthetizer (ABI). Protisměrný primer MBCCHL1 (SEQ ID NO:21) byl navržen tak, aby obsahoval sekvenci rozpoznávající HindIII a Kozakovu sekvenci (Kozak, M. *a kol.*, J. Mol. Biol. 196, 947 až 950, 1987) a primer, směřující po směru, MBCCHL3 (SEQ ID NO:22) byl navržen tak, aby obsahoval sekvenci pro rozpoznání BglII a RcoRI.

PCR bylo provedeno ve 100 µl reakčního roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,1 µg MBC1L24, 50 pmol každého primeru MBCCHL1 a MBCCHL3 a 1 µl AmpliTaq (Perkin-Elmer). Přes toto bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR proběhlo ve 30 cyklech za následujících podmínek: 94 °C 45 s, 60 °C 45 s a 72 °C 2 min.

Produkt PCR o velikosti 444 bp byl podroben elektroforéze v 3% agarózovém gelu, poté byl shromážděn a přečištěn použitím GENE CLEAN II Kit (BIO101). Přečištěný produkt PCR byl rozpuštěn ve 20 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Produkt PCR (1 µl) byl naštěpen ve 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 8 U HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 8 U EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Roztok po štěpení byl podroben extrakci fenol/chloroformem a požadovaná DNA byla z tohoto roztoku získána ethanolovým srážením. DNA byla rozpuštěna v 8 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Stejným postupem byl plasmid pUC19 (1 µg) naštěpen enzymy HindIII a EcoRI. Rovněž byl podroben extrakci fenol/chloroformem a poté ethanolovému srážení. Získaný naštěpený plasmid byl ošetřen alkalickou fosfatázou (BAP) (*E. coli* C75; Takara Shuzo Co., Ltd.).

Výsledný reakční roztok byl extrahován fenol/chloroformem a DNA byla získána ethanolovým srážením. DNA byla rozpuštěna v 10 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plasmid pUC19 (1 µl), ošetřený BAP, byl ligován do výše získaného produktu PCR (4 µl) pomocí soupravy DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný plasmid byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 (Nippon Gene Co., Ltd.) stejným způsobem jako je uvedeno výše. Výsledkem byl transformant, který byl rozetřen na agarové médium 2xYT, obsahující 50 µg/ml ampicilinu a byl kultivován při teplotě 37 °C přes noc. Výsledný transformant byl poté kultivován při teplotě 37 °C ve 2 ml média 2xYT, které obsahovalo 50 µg/ml ampicilinu. Z buněčné frakce byl plasmid přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Poté, co byla stanovena nukleotidová sekvence, byl plasmid, u kterého byla potvrzena správná nukleotidová sekvence, označen jako „CHL/pUC19“.

Plasmidy Cλ/pUC19 a Cκ/pUC19 (1 µg každého) byly naštěpeny v reakčním roztoku o objemu 20 µl obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 U HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 U BlnI (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Roztok po štěpení byl podroben extrakci fenol/chloroformem a DNA byla z tohoto roztoku získána ethanolovým srážením. DNA byla ošetřena BAP při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Reakční roztok byl extrahován fenol/chloroformem a DNA z něj byla získána ethanolovým srážením. DNA byla rozpuštěna v 10 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plasmid CHL/pUC19, který obsahoval DNA kódující V-oblast L-řetězce #23-57-137-1 (8 µg), byl stejným způsobem jako je uvedeno výše naštěpen enzymy HindIII a BlnI. Tím byl získán DNA fragment o velikosti 409 bp. DNA fragment byl podroben elektroforéze v 3% agarózovém gelu, poté byl shromážděn a přečištěn z gelu pomocí GENECLAN II Kit (BIO101). DNA byla rozpuštěna v 10 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

DNA pro V-oblast L-řetězce (4 µl) byla subklonována do 1 µl plasmidů Cλ/pUC19 a Cκ/pUC19, ošetřených BAP, a poté byla začleněna do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován přes noc ve 3 ml média 2xYT, které obsahovalo 50 µg/ml ampicilinu. Z buněčné frakce byl plasmid izolován a přečištěn pomocí QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Takto připravené plasmidy byly označeny „MBC1L(λ)/pUC19“ a „MBC1L(κ)/pUC19“.

Oba plasmidy MBC1L(λ)/pUC19 i MBC1L(κ)/pUC19 byly naštěpeny EcoRI a poté byly podrobeny elektroforéze v 3% agarózovém gelu. DNA fragment o velikosti 743 bp byl z gelu izolován a přečištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) a poté byl rozpuštěn v 10 μ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Expresní vektor (plasmid HEF-PM1k-gk) (2,7 μ g) byl naštěpen EcoRI a poté byl extrahován fenol/chloroformem. DNA z něj byla získána ethanolovým srážením. DNA fragment byl ošetřen BAP a poté byl podroben elektroforéze v 1% agarózovém gelu. DNA fragment o velikosti 6561 bp byl z gelu izolován a přečištěn pomocí GENE CLEAN II Kit (BIO101). Přečištěný DNA fragment byl rozpuštěn v 10 μ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

HEF vektor (2 μ l), ošetřený BAP, byl ligován do EcoRI fragmentu (3 μ l) každého plasmidu MBC1L(λ)/pUC19 a MBC1L(κ)/pUC19. Produkt ligace byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT, které obsahovalo 50 μ g/ml ampicilinu. Z buněčné frakce byl plasmid přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Přečištěný plasmid byl naštěpen v reakčním roztoku o objemu 20 μ l obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 U HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 U PvuI (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Touto reakcí byly získány fragmenty o velikosti 5104/2195 bp a to v případě, že fragment byl inzertován ve správné orientaci nebo byly získány fragmenty o velikosti 4378/2926 bp a to tehdy, pokud byl fragment inzertován v opačné orientaci. Plasmid, u něhož bylo potvrzeno, že má fragment ve správné orientaci, byl označen jako „MBC1L(λ)/neo“ pro plasmid MBC1L(λ)/pUC19 nebo jako „MBC1L(κ)/neo“ pro plasmid MBC1L(κ)/pUC19.

(4) Transfekce buňky COS-7

Pro zjištění vazebné aktivity pro antigen a neutralizační aktivity chimerických protilátek, byly expresní plasmidy připravené výše uvedeným postupem, jednotlivě přechodně exprimovány v buňce COS-7.

Přechodná exprese chimerických protilátek byla provedena pomocí každé z kombinací plasmidů MBC1HcDNA/pCOS1 a MBC1L(λ)/neo a plasmidů MBC1HcDNA/pCOS1 a MBC1L(κ)/neo společnou transfekcí buňky COS-7 plasmidy. Za tímto účelem byla použita elektroporace v zařízení Gene Pulser (Bio Rad). To znamená, že k suspenzi COS-7 buněk (0,8 ml; 1×10^7 buněk/ml) v PBS(-) byly přidány plasmidy (10 μ g každého). Do výsledného roztoku

byly aplikovány pulsy o elektrostatické kapacitě 1 500 V a 2 μ F s cílem uskutečnit elektroporaci. Po 10 min. při laboratorní teplotě byly buňky po elektroporaci suspendovány v médiu DMEM (GIBCO) obsahujícím 2% FCS Ultra Low IgG (GIBCO). Poté byly kultivovány v kultivačních miskách o průměru 10 cm v CO₂ inkubátoru. Po 72 h kultivace byl supernatant kultury shromážděn a aby byly odstraněny buněčné zbytky, byl odstředěn. Tím byl získán vzorek pro následnou ELISA. V tomto postupu bylo přečištění chimerické protilátky ze supernatantu kultury COS-7 buněk provedeno pomocí soupravy AffiGel Protein A MAPSII Kit (Bio Rad) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy.

(5) ELISA

(i) Stanovení koncentrace protilátek

Mikrotitrační destička pro ELISA pro stanovení koncentrace protilátek byla připravena následujícím způsobem. Každá jamka mikrotitrační destičky pro ELISA o 96 jamkách (Maxisorp, NUNC) byla potažena 100 μ l pufru používaného pro potahování (0,1 M NaHCO₃, 0,02% NaN₃) obohaceného o kozlí protilátku proti lidským IgG (TAGO) o koncentraci 1 μ g/ml. Poté byla destička blokována 200 μ l ředícího pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN₃, 1% hovězí sérový albumin (BSA); pH 7,2). Do každé jamky destičky byla přidána jednotlivá postupná ředění supernatantu kultury COS-7 buněk, ve kterých byla exprimována každá z chimerických protilátek, nebo byla přidána jednotlivá postupná ředění každé chimerické protilátky *per se* v přečištěné formě. Mikrotitrační destička byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1 h a poté byla promyta roztokem PBS-Tween 20. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno 100 μ l roztoku alkalické fosfatázy konjugované kozlími protilátkami proti lidským IgG (TAGO). Poté co byla destička inkubována při laboratorní teplotě 1 h a byla promyta roztokem PBS-Tween 20, byl do každé jamky přidán roztok substrátu („Sigma 104“, p-nitrofenylfosforečná kyselina, SIGMA) o koncentraci 1 mg/ml. Byla měřena absorbance roztoku při 405 nm na zařízení Microplate Reader (Bio Rad), jehož cílem bylo stanovit koncentraci protilátek. Jako standard byla při tomto stanovení použita přečištěná Hu IgG1 λ .

(ii) Stanovení schopnosti vázat antigen

Destička pro ELISA pro stanovení schopnosti vázat antigen byla připravena následujícím způsobem. Každá jamka mikrotitrační destičky pro ELISA o 96 jamkách byla potažena 100 μ l pufru používaného pro potahování obohaceného o lidský PTHrP (1 až 34) (Peptide Research Institute) v koncentraci 1 μ g/ml. Destička byla poté blokována 200 μ l ředícího pufru. Do každé jamky destičky byla přidána jednotlivá postupná ředění supernatantu kultury COS-7 buněk, ve kterých byla exprimována každá z chimerických protilátek, nebo byla přidána jednotlivá postupná ředění každé chimerické protilátky *per se* v přečištěné formě. Poté co byla destička inkubována při laboratorní teplotě a byla promyta roztokem PBS-Tween 20, bylo do každé jamky mikrotitrační destičky přidáno 100 μ l roztoku alkalické fosfatázy konjugované kozlími protilátkami proti lidským IgG (TAGO). Destička byla inkubována při laboratorní teplotě, byla promyta roztokem PBS-Tween 20 a poté byl do každé jamky přidán roztok substrátu („Sigma 104“, p-nitrofenylfosforečná kyselina, SIGMA) o koncentraci 1 mg/ml. Byla měřena absorbance roztoku při 405 nm na zařízení Microplate Reader (Bio Rad).

Výsledkem bylo zjištění, že chimerické protilátky vykazovaly schopnost vázat se na lidský PTHrP (1 až 34) a klonované V-oblasti myších protilátek měly správné struktury. Rovněž bylo zjištěno, že mezi chimerickou protilátkou s C-oblastí λ řetězce L-řetězce a chimerickou protilátkou s C-oblastí κ řetězce L-řetězce neexistuje ve schopnosti vázat se na PTHrP (1 až 34) žádný rozdíl. C-oblast L-řetězce polidštěné protilátky byla tudíž konstruována pomocí λ řetězce L-řetězce polidštěné protilátky.

(6) Prokázání linie CHO buněk, schopných stabilně produkovat chimerické protilátky

K určení buněčné linie schopné stabilně produkovat chimerické protilátky byly expresní plasmidy připravené výše popsáním způsobem začleněny do CHO buněk (DXB11).

K určení buněčné linie schopné stabilně produkovat chimerické protilátky byla pro CHO buňky použita následující kombinace expresních plasmidů: MBC1HcDNA/pCHO1 a MBC1L(λ)/neo a MBC1HcDNA/pCHO1 a MBC1L(κ)/neo. CHO buňka byla transfekována plasmidy elektroporací v Gene Pulser (Bio Rad) a to následovně: Jednotlivé expresní vektory byly naštěpeny restrikcí enzymem PvuI, aby byly získány lineární DNA. Výsledné DNA byly extrahovány fenolem a chloroformem a shromážděny byly ethanolovým srážením. Takto připravené plasmidové DNA byly podrobeny elektroporaci. To znamená, že každá plasmidová DNA (10 μ g každé) byla přidána k 0,8 ml suspenze CHO buněk v PBS(-) (1×10^7 buněk/ml). Do

výsledného roztoku byly aplikovány pulsy o elektrostatické kapacitě 1 500 V a 25 μ F. Po 10 min. při laboratorní teplotě byly buňky po elektroporaci suspendovány v médiu MEM- α (GIBCO) obsahujícím 10% FCS (GIBCO). Výsledná suspenze byla kultivována ve 3 mikrotitračních destičkách o 96 jamkách (Falcon) v CO₂ inkubátoru. Jeden den po zahájení kultivace bylo médium nahrazeno selektivním médiem (MEM- α médium bez obsahu ribonukleosidů nebo deoxyribonukleosidů (GIBCO) obsahující 10% FCS (GIBCO) a 500 mg/ml látky GENETICIN (G418Sulfate; GIBCO)). Z kultivačního média byly vyselektovány ty buňky, do nichž byl začleněn gen pro protilátku. Selektivní médium bylo nahrazeno čerstvým médiem. Asi po 2 týdnech od výměny média byly buňky mikroskopovány. Jestliže byl pozorován růst požadovaných buněk, bylo u buněk stanoveno množství produkovaných protilátek pomocí ELISA, což je popsáno výše. Buňky, které produkovaly vyšší množství protilátek, byly testovány a vybrány.

Poté byla vybraná buněčná linie, která je schopna stabilně produkovat protilátky, nakultivována v rotační třepačce v MEM médiu bez ribonukleosidu nebo deoxyribonukleosidu, obsahujícím 2% FCS Ultra Low IgG. Třetí a čtvrtý den kultivace byl supernatant kultury shromážděn a aby byly odstraněny buněčné zbytky, byl zfiltrován přes filtr (0,2 μ m, Millipore).

Přečištění chimerických protilátek ze supernatantu kultury CHO buněk bylo provedeno na koloně POROS Protein A (PerSeptive Biosystems) na ConSep LC100 (Millipore) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Přečištěné chimerické protilátky byly poskytnuty jako vzorky pro stanovení neutralizační aktivity a pro zkoušení terapeutické účinnosti na hyperkalcinemická modelová zvířata. Koncentrace a vazebná aktivita pro antigen přečištěných chimerických protilátek byly stanoveny pomocí stejného systému pro ELISA, jako byl uveden výše.

Příklad 4 Konstrukce polidštěné protilátky

(1) Konstrukce H-řetězce polidštěné protilátky

(i) Konstrukce V-oblasti polidštěného H-řetězce

H-řetězec polidštěné protilátky #23-57-137-1 byl připraven technikou CDR-roubování pomocí PCR. Pro přípravu H-řetězce polidštěné protilátky #23-57-137-1 (verze „a“), který obsahuje FR oblasti pocházející z lidské protilátky S31679 (NBRF-PDB; Cuisinier, A. M. a kol., Eur. J. Immunol., 23, 110 až 118, 1993), bylo pro PCR použito následujících 6 primerů: CDR-

roubující primery: MBC1HGP1 (SEQ ID NO:23) a MBC1HGP3 (SEQ ID NO:24) (oba obsahují templátovou DNA sekvenci) a MBC1HGP2 (SEQ ID NO:25) a MBC1HGP4 (SEQ ID NO:26) (oba obsahují netemplátovou DNA sekvenci), přičemž všechny obsahují na obou koncích komplementární sekvenci o velikosti 15 až 21 bp; a vnější primery: MBC1HVS1 (SEQ ID NO:27) a MBC1HVR1 (SEQ ID NO:28) vykazující homologii s CDR-roubujícími primery MBC1HGP1 a MBC1HGP4.

Primery MBC1HGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4 byly separovány v polyakrylamidovém gelu, denaturovaném močovinou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a z něj pak byly známou metodou rozmělnění a promytí extrahovány ((Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a to následovně.

Každý z CDR-roubujících primerů (1 nmol) byl separován v 6% denaturovaném polyakrylamidovém gelu s cílem získat DNA fragmenty. Z výsledných DNA fragmentů, byl ten, který měl žádoucí délku, identifikován na tenké vrstvě silikagelu pomocí ozařování UV paprsky a poté byl z gelu získán metodou rozmělnění a promytí. Výsledná DNA byla rozpuštěna ve 20 μ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. PCR bylo provedeno pomocí TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Roztok pro PCR (100 μ l) obsahoval 1 μ l každého z výše uvedených primerů MBC1HGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4, 0,25 mM dNTP a 2,5 U TaKaRa Ex Taq v pufru. PCR probíhalo v 5 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 1 min.; 55 °C po dobu 1 min. a 72 °C po dobu 1 min. Do výsledného reakčního roztoku byly přidány vnější primery MBC1HVS1 a MBC1HVR1 (50 pmol každého). S použitím této reakční směsi probíhalo PCR za stejných podmínek dalších 30 cyklů. Takto amplifikovaný DNA fragment byl separován elektroforézou v agarózovém gelu v 4% Nu Sieve GTG Agarose (FMC Bio. Products).

Ten kousek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti 421 bp, byl vyříznut a byl z gelu přečištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO 101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Přečištěný DNA fragment byl vysrážen ethanolem a poté byl rozpuštěn ve 20 μ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Výsledná reakční směs po PCR byla použita pro subklonování DNA fragmentu do plasmidu pUC19, který byl naštěpen restrikcími enzymy BamHI a HindIII. Poté byla stanovena nukleotidová sekvence výsledného plasmidu. Plasmid, který měl správnou nukleotidovou sekvenci, byl označen jako „hMBCHv/pUC19“.

(ii) Konstrukce V-oblasti H-řetězce pro cDNA polidštěného H-řetězce

Aby byla DNA pro V-oblast polidštěného H-řetězce konstruována postupem, který je uveden výše, ligována do cDNA C-oblasti Cy1 polidštěného H-řetězce, byla modifikována pomocí PCR. Pro PCR byl protisměrný primer MBC1HVS2 navržen tak, aby hybridizoval se sekvencí kódující 5'oblast vedoucí sekvence pro V-oblast a aby měl Kozakovu sekvenci (Kozak, M. *a kol.*, J. Mol. Biol., 196, 947 až 950, 1987) i místo pro rozpoznání Hind III a EcoRI. Primer MBC1HVR2 směřující po směru byl navržen tak, aby hybridizoval se sekvencí DNA kódující 3'oblast J-oblasti i s DNA sekvencí kódující 5'oblast C-oblasti a aby měl sekvence pro rozpoznání ApaI a SmaI.

PCR bylo provedeno pomocí TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a připojeného pufru. Roztok pro PCR obsahoval 0,4 µg hMBCHv/pUC19 jako matricovou DNA, 50 pmol každého MBC1HVS2 a MBC1HVR2 jako primerů, 2,5 U TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufru. PCR probíhalo ve 30 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 1 min., 55 °C po dobu 1 min. a 72 °C po dobu 1 min. Takto amplifikovaný DNA fragment byl separován elektroforézou v agarózovém gelu na 3% Nu Sieve GTG Agarose (FMC Bio. Products).

Ten kousek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti 456 bp, byl vyříznut a fragment DNA byl z gelu přečištěn pomocí GENECLAN II Kit (BIO 101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Takto přečištěný DNA fragment byl vysrážen ethanolem a poté byl rozpuštěn ve 20 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Takto získaný reakční roztok po PCR byl použit pro subklonování DNA fragmentu do plasmidu pUC19, který byl naštěpen EcoRI a SmaI. Výsledný plasmid byl sekvenován. Jako výsledek byl získán plasmid, který obsahoval DNA kódující V-oblast myšího H-řetězce pocházející z hybridomu #23-57-137-1 a který také obsahoval sekvence pro rozpoznání EcoRI a HindIII a Kozakovu sekvenci na 5'konci a místa pro rozpoznání ApaI a SmaI na svém 3'konci. Tento plasmid byl označen „hMBC1Hv/pUC19“.

(2) Konstrukce expresního vektoru pro H-řetězec polidštěné protilátky

Plasmid RVh-PM1f-cDNA nesoucí cDNA sekvenci pro H-řetězec protilátky hPM1 byl naštěpen ApaI a BamHI za vzniku fragmentu obsahujícího DNA fragment, který obsahoval DNA kódující C-oblast H-řetězce. DNA fragment byl začleněn do plasmidu hMBC1Hv/pUC19, který byl naštěpen ApaI a BamHI. Získaný plasmid byl označen jako „hMBC1HcDNA/pUC19“. Tento plasmid obsahoval jak DNA kódující V-oblast H-řetězce

polidštěné protilátky #23-57-137-1 tak i DNA kódující C-oblast Cy1 lidského H-řetězce a rovněž měl sekvence pro rozpoznání EcoRI a HindIII na 5'konci a místo pro rozpoznání BamHI na svém 3'konci. Nukleotidová sekvence a odpovídající aminokyselinová sekvence pro verzi „a“ polidštěného H-řetězce, kterou nese plasmid hMBC1HcDNA/pUC19 jsou ukázány v SEQ ID NO:58 a SEQ ID NO:56.

Plasmid hMBC1HcDNA/pUC19 byl naštěpen EcoRI a BamHI za vzniku DNA fragmentu, který obsahoval DNA kódující H-řetězec. DNA fragment byl začleněn do expresního plasmidu pCOS1, který byl naštěpen EcoRI a BamHI. Tím byl získán expresní plasmid pro polidštěnou protilátku, který byl označen „hMBC1HcDNA/pCOS1“.

Při přípravě plasmidu užitečného pro expresi v CHO buňce byl plasmid hMBC1HcDNA/pUC19 naštěpen EcoRI a BamHI, čímž byl získán DNA fragment, který obsahoval DNA kódující H-řetězec. DNA fragment byl začleněn do expresního vektoru pCHO1, který byl naštěpen EcoRI a BamHI. Výsledkem byl získán expresní plasmid pro polidštěnou protilátku, který byl označen „hMBC1HcDNA/pCHO1“.

(3) Konstrukce hybridní V-oblasti L-řetězce

(i) Příprava hybridní FR1,2/FR3,4 protilátky

Byl připraven gen pro L-řetězec FR hybridu, který má FR oblasti jak z polidštěné protilátky tak i z myši (chimerické) protilátky a u každé oblasti bylo určeno polidštění. V tomto kroku byla připravena hybridní protilátka, která měla FR1 a FR2, které obě pocházely z lidské protilátky a FR3 a FR4, obě z myši protilátky. K přípravě bylo použito restriční místo AflII, umístěné na CDR2.

Plasmidy MBC1L(λ)/neo a hMBC1L(λ)/neo (10 μ g každého) byly jednotlivě naštěpeny ve 100 μ l reakčního roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% BSA a 10 U AflII (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Výsledné roztoky byly podrobeny elektroforéze v 2% agarózovém gelu, čímž byly z plasmidu MBC1L(λ)/neo získány DNA fragmenty o velikosti 6282 bp (označené jako „c1“) a 1022 bp (označené jako „c2“) nebo z plasmidu hMBC1L(λ)/neo DNA fragmenty o velikosti 6282 bp (označené jako „h1“) a 1022 bp (označené jako „h2“). Tyto DNA fragmenty byly z gelů shromážděny a přečištěny pomocí soupravy GENECLANII Kit (BIO101).

Každý c1 a h1 fragment (1 µg) byl ošetřen BAP. DNA fragment byl extrahován fenolem a chloroformem, shromážděn ethanolovým srážením a rozpuštěn v 10 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

DNA fragmenty c1 a h1 (1 µl každého) ošetřené BAP byly ligovány do DNA fragmentů h2 a c2 (4 µl každého) (při teplotě 4 °C přes noc). Každý ligační produkt byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu. Plasmid byl z buněčné frakce přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid kit (QIAGEN).

Přečištěný plasmid byl naštěpen ve 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT a buď 2 U ApaLI (Takara Shuzo Co., Ltd.) nebo 8 U BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.) a HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. V případě, že byl c1-h2 zaligován správně, vznikly v této štěpné reakci fragmenty o velikosti 5560/1246/498 bp (po štěpení ApaI) nebo fragmenty o velikosti 7134/269 bp (po štěpení BamHI/HindIII). Na základě tohoto předpokladu byly identifikovány žádoucí plasmidy.

Expresní vektor kódující L-řetězec hybridní lidské FR1,2/myší FR3,4 protilátky byl označen „h/mMBC1L(λ)/neo“. Na druhé straně klon pro h1-c1 nebyl získán. U vektoru pUC byla tedy uskutečněna rekombinace a výsledný rekombinantní produkt byl klonován do vektoru HEF. Při tomto postupu byly jako matrice použity plasmidy hMBC1Laλ/pUC19, který obsahoval DNA kódující V-oblast L-řetězce polidštěné protilátky bez nahrazení jakékoliv aminokyseliny a plasmid hMBC1Ldλ/pUC19, který obsahoval DNA kódující V-oblast L-řetězce polidštěné protilátky bez nahrazení aminokyseliny tyrosinu v FR3 v pozici 91 (tzn. podle Kabatova předpisu 87 aminokyselina) isoleucinem.

Plasmidy MBC1L(λ)/pUC19, hMBC1Laλ/pUC19 a hMBC1Ldλ/pUC19 (10 µg každého) byly jednotlivě naštěpeny ve 30 µl reakčního roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% BSA, 16 U HindIII a 4 U AflII. Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Reakční roztoky byly jednotlivě podrobeny elektroforéze v 2% agarózovém gelu, čímž byl z plasmidu MBC1L(λ)/pUC19 získán DNA fragment o velikosti 215 bp (označený jako „c2“) a z plasmidů hMBC1Laλ/pUC19 a hMBC1Ldλ/pUC19 DNA fragment o velikosti 3218 bp (označený jako „ha1“ a „hd1“). Tyto DNA fragmenty byly shromážděny a přečištěny pomocí soupravy GENECLANII Kit (BIO101).

Fragmenty ha1' a hd1' byly ligovány k fragmentu c2' a poté byly začleněny do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován ve 2 ml

média 2xYT obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu. Plasmid byl z buněčné frakce přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Takto připravené plasmidy byly označeny „m/hMBC1Laλ/pUC19“ u plasmidu s fragmentem ha1' a „m/hMBC1Ldλ/pUC19“ u plasmidu s fragmentem hd1'.

Plasmidy m/hMBC1Laλ/pUC19 a m/hMBC1Ldλ/pUC19 byly naštěpeny EcoRI. DNA fragment o velikosti 743 bp byl podroben elektroforéze v 2% agarózovém gelu a poté byl z gelu získán a přečištěn pomocí soupravy GENECLANII Kit (BIO101). Získaný DNA fragment byl rozpuštěn ve 20 µl roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Každý z DNA fragmentů (4 µl každého) byl ligován do výše uvedeného vektoru HEF, ošetřeného BAP (1 µl). Ligační produkt byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu. Plasmid byl z buněčné frakce přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Každý přečištěný plasmid byl naštěpen ve 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 U HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 U PvuI (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Plasmid byl poté identifikován na základě předpokladu, že: byl-li DNA fragment inzertován do plasmidu ve správné orientaci, pak by toto štěpení mělo poskytnout fragment o velikosti 5104/2195 bp, zatímco, byl-li DNA fragment inzertován do plasmidu v opačné orientaci, pak by toto štěpení mělo poskytnout fragment o velikosti 4378/2926 bp. Takto získané plasmidy byly expresními vektory kódujícími L-řetězec hybridní myši FR1,2/lidskéFR3 protilátky. Expresní vektory byly označeny „m/hMBC1Laλ/neo a m/hMBC1Ldλ/neo“.

(ii) Příprava hybridní FR1/FR2 protilátky

FR1/FR2 hybridní protilátka byla připravena stejným způsobem jako je uveden výše, ale s využitím restrikčního místa SnaBI umístěného na CDR1.

Plasmidy MBC1L(λ)/neo a h/MBC1L(λ)/neo (10 µg každého) byly jednotlivě naštěpeny ve 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% BSA a 6 U SnaBI (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Výsledné reakční roztoky byly dále naštěpeny v 50 µl reakčního roztoku obsahujícího 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 0,01% BSA a 6 U PvuI. Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h.

Výsledné reakční roztoky byly jednotlivě podrobeny elektroforéze v 1,5% agarózovém gelu, čímž byly z plasmidu MBC1L(λ)/neo získány DNA fragmenty o velikosti 4955 bp (m1) a 2349 bp (m2) a z plasmidu h/mMBC1L(λ)/neo DNA fragmenty o velikosti 4955 bp (hm1) a 2349 bp (hm2). Tyto DNA fragmenty byly z gelů shromážděny a přečištěny pomocí soupravy GENECLANII Kit (BIO101). Každý získaný DNA fragment byl rozpuštěn ve 40 μ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Fragmenty m1 a hm1 (1 μ l každého) byly ligovány do fragmentů hm2 a m2 (4 μ l každého). Každý ze vzniklých ligačních produktů byl začleněn do kompetentní buňky *E. coli* JM109 za vzniku transformantu. Získaný transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT obsahujícího 50 μ g/ml ampicilinu. Plasmid byl z buněčné frakce přečištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Každý přečištěný plasmid byl naštěpen ve 20 μ l reakčního roztoku, obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT a buď 8 U ApaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) nebo 2 U ApaLI (Takara Shuzo Co., Ltd.). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 h.

V případě, že byly fragmenty zaligovány správně, mělo by toto štěpení poskytnout fragment o velikosti 7304 bp (po štěpení ApaI) nebo fragmenty 5560/1246/498 bp (po štěpení ApaLI) v případě m1-hm2 a fragmenty o velikosti 6538/766 bp (po štěpení ApaI) nebo fragmenty 3535/2025/1246/498 bp (po štěpení ApaLI) v případě hm1-m2. Na základě tohoto předpokladu byly plasmidy identifikovány. Jako výsledek byly získány expresní vektor kódující L-řetězec hybridní lidská FR1/myší FR2,3,4 protilátky (označený jako „hmmMBC1L(λ)/neo“) a expresní vektor kódující L-řetězec hybridní myší FR1/lidská FR2/myší FR3,4 protilátky (označený jako „mhmMBC1L(λ)/neo“).

(4) Konstrukce L-řetězce polidštěné protilátky

L-řetězec polidštěné protilátky #23-57-137-1 byl připraven technikou CDR-roubování pomocí PCR. Při přípravě L-řetězce polidštěné protilátky #23-57-137-1 (verze „a“), který obsahuje FR1, FR2 a FR3 oblasti pocházející z lidské protilátky HSU03868 (GEN-BANK, Deftos M. *a kol.*, Scand. J. Immunol., 39, 95 až 103, 1994) a FR4 pocházející z lidské protilátky S25755 (NBRF-PDB) bylo pro PCR použito 6 primerů.

Těchto 6 primerů bylo následujících: Primery MBC1LGP1 (SEQ ID NO:29) a MBC1LGP3 (SEQ ID NO:30), které oba obsahují templátovou DNA sekvenci, primery MBC1LGP2 (SEQ ID NO:31) a MBC1LGP4 (SEQ ID NO:32), které oba obsahují netemplátovou DNA sekvenci a všechny obsahují na obou koncích komplementární sekvenci o

velikosti 15 až 21 bp; a vnější primery MBC1LVS1 (SEQ ID NO:33) a MBC1LVR1 (SEQ ID NO:34), vykazující homologii s primery MBC1LGP1 a MBC1LGP4.

Primery MBC1LGP1, MBC1LGP2, MBC1LGP3 a MBC1LGP4 byly separovány v polyakrylamidovém gelu, denaturovaném močovinou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Z gelu pak byl metodou rozmělnění a promytí extrahován příslušný kousek ((Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *a kol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Každý primer roubující CDR (1 nmol) byl separován v 6% denaturovaném polyakrylamidovém gelu. Identifikace DNA fragmentu, který měl žádoucí délku, byla provedena na tenké vrstvě silikagelu pomocí ozařování UV paprsky. Žádoucí fragment byl z gelu získán metodou rozmělnění a promytí. Získaný DNA fragment byl rozpuštěn ve 20 μ l roztoku, obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

PCR bylo provedeno pomocí TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a pufru. Roztok pro PCR obsahoval (na 100 μ l) 1 μ l každého CDR-roubujícího primeru MBC1LGP1, MBC1LGP2, MBC1LGP3 a MBC1LGP4, 0,25 mM dNTP a 2,5 U TaKaRa Ex Taq v pufru. PCR probíhalo v 5 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 1 min.; 55 °C po dobu 1 min. a 72 °C po dobu 1 min. Do výsledné reakční směsi bylo přidáno 50 pmol každého vnějšího primeru MBC1LVS1 a MBC1LVR1. S použitím této reakční směsi probíhalo PCR za stejných podmínek dalších 30 cyklů. Takto amplifikovaný DNA fragment byl separován elektroforézou v agarózovém gelu v 3% Nu Sieve GTG Agarose (FMC Bio. Products).

Kousek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti 421 bp, byl vyříznut a příslušný fragment byl z gelu přečištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO 101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Takto získaná reakční směs po PCR byla použita pro subklonování DNA fragmentu do plasmidu pUC19, který byl naštěpen restrikcčními enzymy BamHI a HindIII. Výsledný plasmid byl sekvenován. Takto připravený plasmid byl označen jako „hMBCL/pUC19“. V tomto plasmidu však byla aminokyselina v pozici 104 (odpovídající 96 aminokyselině podle Kabatova předpisu) v CDR4 nahrazena argininem. Pro opravu aminokyseliny na tyrosin byl navržen a syntetizován správný primer MBC1LGP10R (SEQ ID NO:35). PCR bylo provedeno pomocí soupravy TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a k ní připojenému pufru. Reakční roztok pro PCR obsahoval (na 100 μ l) 0,6 μ g plasmidu hMBCL/pUC19 jako matricové DNA, 50 pmol každého primeru MBC1LVS1 a MBC1LGP10R, 2,5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 0,25 mM dNTP v pufru. Toto vše bylo převrstveno minerálním olejem (50 μ l). PCR probíhalo ve 30 cyklech za těchto podmínek: 94 °C po dobu 1 min.; 55 °C po dobu 1 min. a 72 °C po dobu 1 min. Takto amplifikovaný DNA

fragment byl separován elektroforézou v 3% agarózovém gelu (Nu Sieve GTG Agarose; FMC Bio. Products).

Kousek agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA o velikosti 421 bp, byl vyříznut a příslušný fragment byl z gelu přečištěn pomocí soupravy GENECLAN II Kit (BIO 101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy. Takto získaná reakční směs po PCR byla použita pro subklonování DNA fragmentu do plasmidu pUC19, který byl naštěpen restričními enzymy BamHI a HindIII.

Plasmid byl sekvenován použitím M13 Primer M4 a M13 Primer RV. Závěrem bylo potvrzeno, že plasmid měl správnou sekvenci. Poté byl plasmid naštěpen HindIII a BlnI a DNA fragment o velikosti 416 bp byl separován elektroforézou v 1% agarózovém gelu. DNA fragment byl přečištěn pomocí soupravy GENECLAN II Kit (BIO 101) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy a poté byl začleněn do plasmidu Cλ/pUC19, který byl naštěpen restričními enzymy HindIII a BlnI. Výsledný plasmid byl označen „hMBC1Laλ/pUC19“. Tento plasmid byl naštěpen EcoRI za vzniku DNA fragmentu kódujícího polidštěný L-řetězec. DNA fragment byl začleněn do plasmidu pCOS1 tak, aby byl iniciační kodón pro polidštěný L-řetězec umístěn proti směru transkripce („downstream“) k EF1α promotoru. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Laλ/pCOS1“. DNA sekvence (včetně odpovídající aminokyselinové sekvence) polidštěného L-řetězce verze „a“ je ukázána v SEQ ID NO:66. Aminokyselinová sekvence verze „a“ je ukázána v SEQ ID NO:47.

Polidštěný L-řetězec verze „b“ byl připraven pomocí mutagenese technikou PCR. Verze „b“ byla navržena tak, že ve verzi „a“ byla aminokyselina glycin v pozici 43 (podle Kabatova předpisu odpovídající 43 aminokyselině) nahrazena prolinem a aminokyselina lysin v pozici 49 (podle Kabatova předpisu odpovídající 49 aminokyselině) kyselinou asparagovou. PCR bylo provedeno pomocí plasmidu hMBC1Laλ/pUC19 jakožto matrice, s mutagenním primerem MBC1LGP5R (SEQ ID NO:36) a primerem MBC1LVS1. Získaný DNA fragment byl naštěpen BamHI a HindIII a fragment po štěpení byl subklonován do BamHI-HindIII místa plasmidu pUC19. Po sekvenování byl plasmid naštěpen HindIII a AflII a výsledný fragment byl ligován do plasmidu hMBC1Laλ/pUC19, který byl naštěpen enzymy HindIII a AflII.

Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lbλ/pUC19“. Tento plasmid byl naštěpen EcoRI za vzniku DNA fragmentu, který obsahoval DNA kódující polidštěný L-řetězec. DNA fragment byl začleněn do plasmidu pCOS1 tak, aby byl iniciační kodón pro polidštěný L-řetězec umístěn downstream k EF1α promotoru. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lbλ/pCOS1“.

Polidštěný L-řetězec verze „c“ byl připraven pomocí mutagenese technikou PCR. Verze „c“ byla navržena tak, že aminokyselina serin v pozici 84 (podle Kabatova předpisu odpovídající 80 aminokyselině) byla nahrazena prolinem. PCR bylo provedeno pomocí plasmidu hMBC1Laλ/pUC19 jakožto matrice, s mutagenním primerem MBC1LGP6S (SEQ ID NO:37) a primerem M13 Primer RV. Získaný DNA fragment byl naštěpen BamHI a HindIII a poté byl subklonován do pUC19, který byl naštěpen BamHI a HindIII.

Po sekvenování byl plasmid naštěpen BstPI a Aor5IHI a výsledný DNA fragment byl ligován do plasmidu hMBC1Laλ/pUC19, který byl naštěpen enzymy BstPI a Aor5IHI. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lcλ/pUC19“. Tento plasmid byl naštěpen EcoRI za vzniku DNA fragmentu, který obsahuje DNA kódující polidštěný L-řetězec. Fragment byl začleněn do EcoRI místa plasmidu pCOS1 tak, aby byl iniciační kodón pro polidštěný L-řetězec umístěn downstream k EF1α promotoru. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lcλ/pCOS1“.

Polidštěný L-řetězec verze „d“, „e“ a „f“ byl připraven pomocí mutagenese technikou PCR. Verze „d“, „e“ a „f“ byly navrženy tak, že aminokyselina tyrosin v pozici 91 (podle Kabatova předpisu odpovídající 87 aminokyselině) byla ve verzích „a“, „b“ a „c“ nahrazena isoleucinem. Pro verze „d“, „e“ a „f“ bylo PCR provedeno pomocí plasmidů hMBC1Laλ/pCOS1 (pro verzi „d“), hMBC1Lbλ/pCOS1 (pro verzi „e“) a hMBC1Lcλ/pCOS1 (pro verzi „f“) jakožto matrice, mutagenního primeru MBC1LGP11R (SEQ ID NO:38) a primeru M-S1 (SEQ ID NO:44). Takto získaný DNA fragment byl naštěpen BamHI a HindIII a poté byl subklonován do pUC19, který byl naštěpen BamHI a HindIII. Po sekvenování byl plasmid naštěpen HindIII a BlnI a výsledný fragment byl ligován do plasmidu Cλ/pUC19, který byl naštěpen enzymy HindIII a BlnI.

Takto získané plasmidy byly označeny „hMBC1Ldλ/pUC19“ (pro verzi „d“), „hMBC1Leλ/pUC19“ (pro verzi „e“) a „hMBC1Lfλ/pUC19“ (pro verzi „f“). Každý z těchto plasmidů byl naštěpen EcoRI za vzniku DNA fragmentu, který obsahuje DNA kódující polidštěný L-řetězec. DNA fragment byl začleněn do EcoRI místa plasmidu pCOS1 tak, aby byl iniciační kodón pro polidštěný L-řetězec umístěn downstream k EF1α promotoru plasmidu. Takto získané plasmidy byly označeny „hMBC1Ldλ/pCOS1“ (pro verzi „d“), „hMBC1Leλ/pCOS1“ (pro verzi „e“), „hMBC1Lfλ/pCOS1“ (pro verzi „f“).

Polidštěný L-řetězec verze „g“ a „h“ byl rovněž připraven pomocí mutagenese technikou PCR. Verze „g“ a „h“ byly navrženy tak, že aminokyselina histidin v pozici 36 (podle Kabatova předpisu odpovídající 36 aminokyselině) byla nahrazena ve verzích „a“ a „d“ tyrosinem. PCR

bylo provedeno pomocí mutageního primeru MBC1LGP9R (SEQ ID NO:39), primeru M-13 Primer RV a plasmidu hMBC1Laλ/pUC19 jakožto matrice. Další PCR bylo provedeno pomocí získaného produktu PCR, primeru M13 Primer M4 a plasmidu hMBC1Laλ/pUC19 jako matrice. Takto získaný DNA fragment byl naštěpen HindIII a BlnI a poté byl subklonován do Cλ/pUC19, který byl naštěpen HindIII a BlnI. Pomocí tohoto plasmidu jakožto matrice bylo provedeno PCR s primery MBC1LGP13R (SEQ ID NO:40) a MBC1LVS1. Takto získaný fragment byl naštěpen ApaI a HindIII a poté byl začleněn buď do plasmidů hMBC1Laλ/pUC19 nebo do hMBC1Ldλ/pUC19, které byly naštěpeny enzymy ApaI a HindIII. Získané plasmidy byly sekvenovány. Plasmidy, u nichž byla potvrzena správná sekvence, byly označeny „hMBC1Lgλ/pUC19“ (pro verzi „g“) a „hMBC1Lhλ/pUC19“ (pro verzi „h“). Každý z těchto plasmidů byl naštěpen EcoRI za vzniku DNA fragmentu, který obsahoval DNA kódující polidštěný L-řetězec. DNA fragment byl začleněn do EcoRI místa plasmidu pCOS1 tak, aby byl iniciační kodón pro polidštěný L-řetězec umístěn downstream k EF1α promotoru. Takto získané plasmidy byly označeny „hMBC1Lgλ/pCOS1“ (pro verzi „g“) a „hMBC1Lhλ/pCOS1“ (pro verzi „h“).

Polidštěný L-řetězec verze „i“, „j“, „k“, „l“, „m“, „n“ a „o“ byl rovněž připraven pomocí mutagenize technikou PCR. PCR bylo provedeno s plasmidem hMBC1Laλ/pUC19 jako matricí, mutagením primerem MBC1LGP14S (SEQ ID NO:41) a primerem VIRV (λ) (SEQ ID NO:43). Výsledný DNA fragment byl naštěpen ApaI a BlnI a poté byl subklonován do plasmidu hMBC1Lgλ/pUC19, který byl naštěpen ApaI a BlnI. Takto získaný plasmid byl sekvenován a byl vybrán klon, do kterého byla začleněna mutace každé verze. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lxλ/pUC19“ (x = i, j, k, l, m, n nebo o). Tento plasmid byl naštěpen EcoRI za vzniku DNA fragmentu, který obsahuje DNA kódující polidštěný L-řetězec. DNA fragment byl začleněn do EcoRI místa plasmidu pCOS1 tak, aby byl iniciační kodón pro polidštěný L-řetězec umístěn downstream k EF1α promotoru. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lxλ/pCOS1“ (x = i, j, k, l, m, n nebo o). DNA sekvence (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) verzí „j“, „l“, „m“ a „o“ jsou ukázány v SEQ ID NO:67, 68, 69 a 70. Aminokyselinové sekvence těchto verzí jsou ukázány v SEQ ID NO: 48, 49, 50 a 51.

Verze „p“, „q“, „r“, „s“ a „t“ polidštěného L-řetězce byly navrženy tak, že aminokyselina (tyrosin) v pozici 87 byla ve verzích „i“, „j“, „m“, „l“ a „o“ nahrazena isoleucinem. Tyto verze byly připraveny využitím restrikčního místa Aor51MI v FR3 a nahrazením tohoto místa ve verzi „i“, „j“, „m“, „l“ nebo „o“ stejným místem verze „h“. To znamená, že z expresního plasmidu hMBC1Lxλ/pCOS1 (x = i, j, m, l nebo o) byly odstraněny restrikční fragment Aor51HI (514 bp)

obsahující CDR3, část FR3 a celá FR4. Do odstraněného místa byl ligován restriční fragment Aor5IHI (514 bp) v expresním plasmidu hMBC1Lhλ/pCOS, který obsahuje CDR3, část FR3 a celou FR4. Ligace proběhla tak, že aminokyselina tyrosin v pozici 91 (podle Kabatova předpisu odpovídající 87 aminokyselině) byla nahrazena isoleucinem. Výsledný plasmid byl sekvenován. Byl vybrán ten klon každé verze „i“, „j“, „m“, „l“ a „o“, ve kterém byla aminokyselina tyrosin v pozici 91 (podle Kabatova předpisu odpovídající 87 aminokyselině) nahrazena isoleucinem. Tyto modifikované verze odpovídající verzím „i“, „j“, „m“, „l“ a „o“ byly označeny jako verze „p“, „q“, „s“, „r“ a „t“. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lxλ/pCOS1“ (x = p, q, s, r nebo t). DNA sekvence (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) verzí „q“, „r“, „s“ a „t“ jsou ukázány v SEQ ID NO: 71, 72, 73 a 74. Aminokyselinové sekvence těchto verzí jsou ukázány v SEQ ID NO: 52, 53, 54 a 55.

Plasmid hMBC1Lqλ/pCOS1 byl naštěpen HindIII a EcoRI a poté byl subklonován do plasmidu pUC19, který byl naštěpen HindIII a EcoRI. Takto získaný plasmid byl označen „hMBC1Lqλ/pUC19“.

Pozice nahrazených aminokyselin v jednotlivých verzích polidštěného L-řetězce jsou ukázány v tab. 2.

Tabulka 2 Pozice nahrazených aminokyselin v seznamu sekvencí
(číslování aminokyselin je v souladu s předpisem podle Kabata)

Verze	36	43	45	47	49	80	87
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			

tab. 2 - pokračování

Verze	36	43	45	47	49	80	87
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

V tab. 2 velká písmena reprezentují následující aminokyseliny: Y: tyrosin; P: prolin; K: lysin; V: valin; D: kyselina asparagová; a I: isoleucin.

Kmeny *E. coli*, které obsahují plasmidy hMBC1HcDNA/pUC19 a hMBC1Lqλ/pUC19 byly označeny „*Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19)“ a „*Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19)“ a byly v souladu s podmínkami Budapešťské dohody uloženy 15. srpna 1996 pod přístupovým číslem FERM BP-5629 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) a FERM BP-5630 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japonsko, (1 až 3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko).

(5) Transfekce do buňky COS-7

Pro zjištění vazebné aktivity pro antigen a neutralizační aktivity hybridních protilátek a polidštěných protilátek #23-57-137-1, byly expresní plasmidy připravené výše uvedeným postupem přechodně exprimovány v buňkách COS-7. Pro přechodnou expresi L-řetězce hybridních protilátek byly elektroporací pomocí Gene Pulser (Bio Rad) transfekovány do buňky COS-7 následující kombinace plasmidů: hMBC1HcDNA/pCOS1 a h/mMBC1L(λ)/neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a m/hMBC1Laλ/neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a m/hMBC1Ldλ/neo;

hMBC1HcDNA/pCOS1 a hmmMBC1L(λ)/neo; a hMBC1HcDNA/pCOS1 a mhmMBC1L(λ)/neo. To znamená, že k suspenzi COS-7 buněk (0,8 ml) v PBS(-) (1×10^7 buněk/ml) byly přidány jednotlivé kombinace plasmidových DNA (10 μ g každé). Do výsledného roztoku byly aplikovány pulsy o elektrostatické kapacitě 1 500 V a 25 μ F. Po 10 min. při laboratorní teplotě byly buňky po elektroporaci suspendovány v médiu DMEM obsahujícím 2% FCS Ultra Low IgG (GIBCO) a poté byly kultivovány v kultivačních miskách o průměru 10 cm v CO₂ inkubátoru. Po 72 h kultivace byl supernatant kultury shromážděn a poté odstředěn, aby byly odstraněny buněčné zbytky. Takto získané roztoky byly poskytnuty pro ELISA.

Pro přechodnou expresi polidštěných protilátek #23-57-137-1 byly elektroporací pomocí Gene Pulser (Bio Rad) transfekovány do buňky COS-7 kombinace plasmidů hMBC1HcDNA/pCOS1 a hMBC1Lx λ /pCOS1 (x = a až t). Transfekce proběhla stejným způsobem jako je popsáno výše pro hybridní protilátky. Připravené supernatanty kultury byly poskytnuty pro použití při ELISA.

Přečištění hybridních protilátek a polidštěných protilátek ze supernatantu kultury COS-7 buněk bylo provedeno pomocí soupravy AffiGel Protein A MAPSII Kit (Bio Rad) v souladu s pokyny, které jsou součástí soupravy.

(6) ELISA

(i) Stanovení koncentrace protilátek

Mikrotitrační destička pro ELISA pro stanovení koncentrace protilátek byla připravena následujícím způsobem. Každá jamka mikrotitrační destičky pro ELISA o 96 jamkách (Maxisorp, NUNC) byla potažena 100 μ l pufru používaného pro potahování (0,1 M NaHCO₃, 0,02% NaN₃) obsahujícího kozlí protilátku proti lidským IgG (TAGO) v koncentraci 1 μ g/ml. Destička byla blokována 200 μ l ředícího pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN₃, 1% hovězí sérový albumin (BSA); pH 7,2). Do každé jamky destičky byla přidána jednotlivá postupná ředění supernatantu kultury COS buněk, ve kterých byla exprimována každá hybridní a polidštěná protilátka nebo byla přidána jednotlivá postupná ředění každé hybridní a polidštěné protilátky *per se* v přečištěné formě. Mikrotitrační destička byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1 h a poté byla promyta roztokem PBS-Tween 20. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno 100 μ l roztoku alkalické fosfatázy konjugované kozlími protilátkami proti lidským IgG (TAGO). Destička byla inkubována při laboratorní teplotě 1 h a poté byla promyta roztokem PBS-Tween 20. Dále byl do každé jamky

přidán roztok substrátu („Sigma 104“, p-nitrofenylfosforečná kyselina, SIGMA) o koncentraci 1 mg/ml. V každé jamce byla na zařízení Microplate Reader (Bio Rad) odečítána absorbance roztoku při 405 nm. Cílem bylo stanovit koncentraci protilátek. Jako standard byla při tomto stanovení použita přečištěná Hu IgG1 λ (The Binding Site).

(ii) Stanovení schopnosti vázat antigen

Destička pro ELISA na stanovení schopnosti vázat antigen byla připravena následujícím způsobem. Každá jamka mikrotitrační destičky pro ELISA o 96 jamkách (Maxisorp, NUNC) byla potažena 100 μ l pufru používaného pro potahování, který obsahoval lidskou PTHrP (1 až 34) v koncentraci 1 μ g/ml. Poté byla destička blokována 200 μ l ředícího pufru. Do každé jamky destičky byla přidána jednotlivá postupná ředění supernatantu kultury COS-7 buněk, ve kterých byla exprimována každá hybridní a polidštěná protilátka nebo byla přidána jednotlivá postupná ředění každé hybridní a polidštěné protilátky *per se* v přečištěné formě. Destička byla inkubována při laboratorní teplotě a poté byla promyta roztokem PBS-Tween 20. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno 100 μ l roztoku alkalické fosfatázy konjugované kozlími protilátkami proti lidským IgG (TAGO). Destička byla inkubována při laboratorní teplotě a poté byla promyta roztokem PBS-Tween 20. Do každé jamky byl přidán roztok substrátu („Sigma 104“, p-nitrofenylfosforečná kyselina, SIGMA) o koncentraci 1 mg/ml. Byla měřena absorbance roztoku při 405 nm na zařízení Microplate Reader (Bio Rad).

(7) Potvrzení aktivit

(i) Stanovení polidštěného H-řetězce

Bylo zjištěno, že protilátka, která má polidštěný H-řetězec verze „a“ a chimerický L-řetězec, vykazovala stejnou schopnost vázat se na PTHrP jako chimerická protilátka. Tento výsledek naznačuje, že verze „a“ dosahuje polidštění V-oblasti H-řetězce a to stupně, který je dostatečný pro zhodnocení polidštění. Polidštěný H-řetězec verze „a“ byl tudíž poskytnut pro použití v následujících experimentech jakožto H-řetězec polidštěné protilátky.

(ii) Aktivita hybridních protilátek

(ii-a) FR1,2/FR3,4 hybridní protilátka

V případě, že L-řetězec byl h/mMBC1L(λ), nebyla zjištěna žádná vazebná aktivita pro antigen. Naopak, jestliže L-řetězec byl buď m/hMBC1La λ nebo m/hMBC1Ld λ , byla zjištěna stejná vazebná aktivita pro antigen jako v případě chimerické protilátky #23-57-137-1. Tyto výsledky naznačují, že problém není v FR3 a FR4, ale že existují aminokyselinové zbytky, které musí být při přípravě polidštěné protilátky nahrazeny v FR1 a FR2.

(ii-b) FR1/FR2 hybridní protilátka

V případě, že L-řetězec byl mhmMBC1L(λ), nebyla zjištěna žádná vazebná aktivita pro antigen. Naopak, jestliže L-řetězec byl hmmMBC1L(λ), byla zjištěna stejná vazebná aktivita pro antigen jako v případě chimerické protilátky #23-57-137-1. Tyto výsledky naznačují, že problém není v FR1, ale že zde existují aminokyselinové zbytky, které musí být při přípravě polidštěné protilátky nahrazeny v FR2.

(iii) Aktivita polidštěných protilátek

U polidštěných protilátek, z nichž každá má L-řetězec verze „a“ až „t“, byla stanovena vazebná aktivita pro antigen. Výsledkem bylo zjištění, že polidštěné protilátky s L-řetězcem verze „j“, „l“, „m“, „o“, „q“, „r“, „s“ a „t“ vykazovaly stejnou vazebnou aktivitu pro PTHrP jako chimerická protilátka.

(8) Prokázání linie CHO buněk, schopných stabilně produkovat protilátku

K určení buněčné linie, schopné stabilně produkovat polidštěné protilátky, byly začleněny expresní plasmidy, které byly připraveny výše popsáním způsobem, do CHO buňky (DXB11).

To znamená, že určení buněčné linie, schopné stabilně produkovat polidštěnou protilátku, bylo provedeno pomocí následujících kombinací plasmidů jakožto expresních vektorů pro CHO buňky: hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lm λ /pCOS1; hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lq λ /pCOS1; a hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lr λ /pCOS1. Tyto plasmidy byly

transfekovány do CHO buňky elektroporací v Gene Pulser (Bio Rad). Expresní vektory byly dále samostatně naštěpeny restriční enzymem PvuI a byly získány lineární DNA fragmenty. Výsledné DNA fragmenty byly extrahovány fenolem a chloroformem a poté byly vysráženy ethanolem. Takto připravené DNA fragmenty byly použity k elektroporaci. To znamená, že plasmidové DNA fragmenty (10 µg každého) byly přidány k 0,8 ml suspenze CHO buněk v PBS(-) (1×10^7 buněk/ml). Do výsledného roztoku byly aplikovány pulsy o elektrostatické kapacitě 1 500 V a 25 µF. Po 10 min. při laboratorní teplotě byly takto ošetřené buňky suspendovány v médiu MEM-α (GIBCO) obsahujícím 10% FCS (GIBCO) a poté byly kultivovány v mikrotitrační destičce o 96 jamkách (Falcon) v CO₂ inkubátoru. Jeden den po zahájení kultivace bylo médium nahrazeno selektivním médiem MEM-α bez ribonukleosidů nebo deoxyribonukleosidů obsahujícím 10% FCS (GIBCO) a 500 mg/ml látky GENETICIN (G418Sulfate; GIBCO). Z kultivačního média byly vyselektovány ty buňky, do nichž byl začleněn gen pro protilátku. Kultivační médium bylo nahrazeno čerstvým médiem. Asi po 2 týdnech od výměny média byly buňky mikroskopovány. Jestliže byl pozorován růst požadovaných buněk, bylo u těchto buněk stanoveno množství produkovaných protilátek pomocí metody ELISA používané pro stanovení koncentrace protilátek, což je popsáno výše. Buňky, které produkovaly vyšší množství protilátek, byly testovány.

Kultura vybrané buněčné linie, která je schopna stabilně produkovat protilátky, byla zmnožena v rotační třepačce v MEM-α médiu bez ribonukleosidu nebo deoxyribonukleosidu, které obsahovalo 2% FCS Ultra Low IgG. Třetí a čtvrtý den kultivace byl supernatant kultury shromážděn a aby byly odstraněny buněčné zbytky, byl zfiltrován přes filtr (0,2 µm, Millipore). Přečištění polidštěných protilátek ze supernatantu kultury CHO buněk bylo provedeno na koloně POROS Protein A Column (PerSeptive Biosystems) pomocí ConSep LC100 (Millipore) v souladu s příloženými pokyny. Polidštěné protilátky byly poskytnuty pro stanovení neutralizační aktivity a pro testování farmakologické účinnosti u hyperkalcinemických modelových zvířat. Koncentrace a vazebná aktivita pro antigen byly u přečištěných polidštěných protilátek stanoveny pomocí stejného systému pro ELISA, jako byl uveden výše.

Příklad 5 Stanovení neutralizační aktivity

Stanovení neutralizační aktivity myších protilátek, chimerických protilátek a polidštěných protilátek bylo provedeno pomocí myelomové buněčné linie buněk potkana ROS17/2.8-5. Buňky ROS17/2.8-5 byly kultivovány v CO₂ inkubátoru v médiu Ham's F-12 (GIBCO) obsahujícím 10% FCS (GIBCO). Buňky ROS17/2.8-5 byly dány do každé z 96 jamek

mikrotitrační destičky v koncentraci 10^4 buněk/100 μ l/jamku a byly kultivovány 1 den. Po ukončení kultivace bylo kultivační médium nahrazeno médiem Ham'S F-12 (GIBCO) obsahujícím 4 mM hydrokortison a 10% FCS. Po 3 až 4 dnech kultivace byly buňky promyty 260 μ l média Ham'S F-12 (GIBCO) a bylo přidáno 80 μ l média Ham'S F-12 obsahujícího 1 mM isobutyl-1-methylxanthin (IMBX, SIGMA), 10% FCS a 10 mM HEPES. Výsledná směs byla inkubována 30 min při teplotě 37 °C.

Kultivační média myších protilátek, chimerických protilátek a polidštěných protilátek, u nichž byla testována neutralizační aktivita, byla předem postupně naředěna v následujících skupinách: (10 μ g/ml, 3,3 μ g/ml, 1,1 μ g/ml a 0,37 μ g/ml), (10 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,5 μ g/ml a 0,01 μ g/ml) a (10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1,25 μ g/ml a 0,63 μ g/ml a 0,31 μ g/ml). Každý zředěný roztok vzorku protilátek byl smíchán s ekvivalentním množstvím PTHrP (1 až 34) o koncentraci 4 ng/ml. Výsledný roztok (80 μ l) byl přidán do každé jamky. V každé jamce byla konečná koncentrace každé protilátky rovna jedné čtvrtině výše uvedené koncentrace protilátky a koncentrace PTHrP (1 až 34) byla 1 ng/ml. Po 10 min. při laboratorní teplotě byl supernatant kultury odstraněn a zbytek byl 3 krát promyt PBS. cAMP v buňkách bylo extrahováno 100 μ l roztoku 0,3% HCl-95% ethanol a poté byl roztok odpařen. Cílem tohoto kroku bylo odstranit zbývající HCl-ethanol. Zbytek byl rozpuštěn ve 120 μ l EIA pufru, který je součástí soupravy cAMP EIA Kit (CAYMAN CHEMICAL'S), s cílem extrahovat cAMP. cAMP bylo stanoveno pomocí soupravy cAMP EIA Kit (CAYMAN CHEMICAL'S) v souladu s přiloženými pokyny. Výsledkem bylo zjištění, že mezi polidštěnými protilátkami, které mají stejnou vazebnou aktivitu pro antigen jako chimerická protilátka, vykazují nejpodobnější neutralizační aktivitu jako chimerická protilátka ty, které mají L-řetězec verze „q“, „r“, „s“ a „t“ (v nichž byl tyrosin v pozici 91 nahrazen isoleucinem). Ty, které mají L-řetězec verze „q“, vykazují nejvyšší neutralizační aktivitu.

Předmětná specifikace zahrnuje obsah popsaný ve specifikaci a obrázky japonské patentové přihlášky č. 10-180143, což je prioritní dokument předmětné přihlášky.

Všechny publikace, patenty a patentové přihlášky, které jsou zde citovány, jsou zde začleněny jako odkaz.

Průmyslová využitelnost

Předmětný vynález poskytuje terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem, které obsahuje jako aktivní složku látku, která je schopna inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem.

Ve srovnání se skupinou, již je podávána kontrolní látka a se skupinou, již je podáváno rozpouštědlo (tzn. kontrolní skupina) vykazuje látka rychlejší nástup a delší trvání účinku. Látka je také užitečná jako terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi související s maligním nádorem, která musí být neodkladně léčena.

Text pro seznam sekvencí:

SEQ ID NO: 1: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 2: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 3: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 4: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 5: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 6: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 7: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 8: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 9: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 10: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 11: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 12: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 13: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 14: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 15: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 16: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 17: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 18: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 19: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 20: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 21: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 22: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 23: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 24: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 25: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 26: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 27: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 28: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 29: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 30: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 31: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 32: Syntetická DNA
SEQ ID NO: 33: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 34: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 35: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 36: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 37: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 38: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 39: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 40: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 41: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 42: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 43: Syntetická DNA

SEQ ID NO: 44: Syntetická DNA

PATENTOVÉ NÁROKY

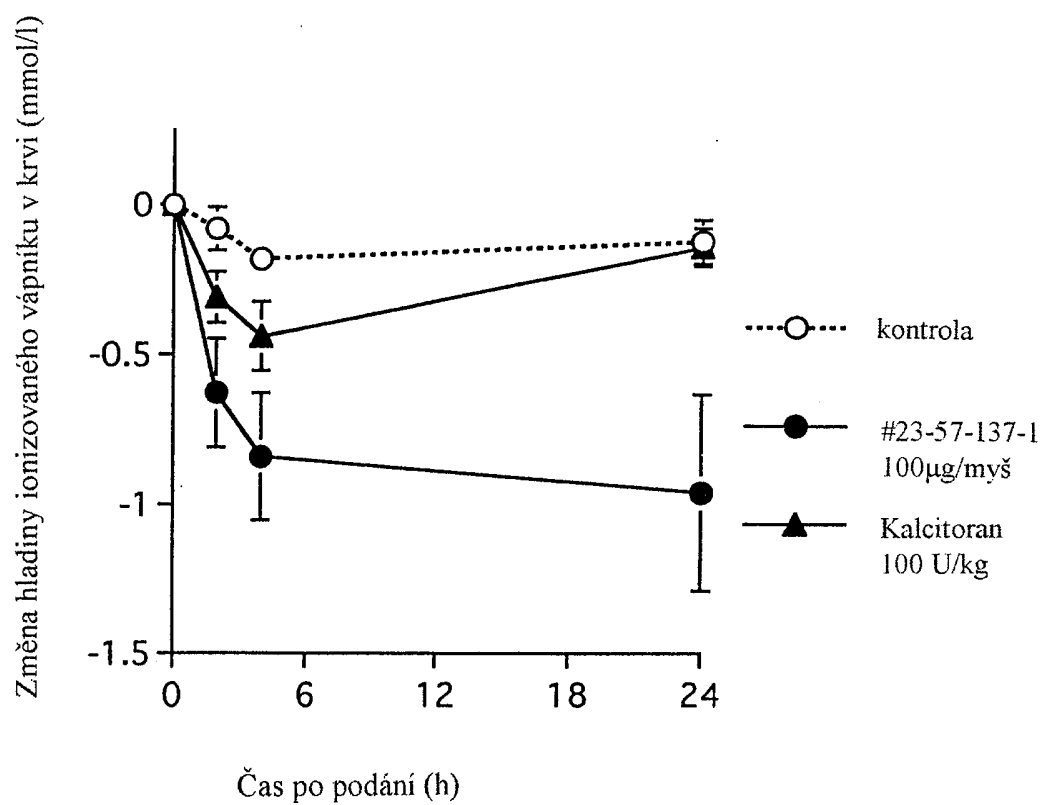
1. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi, které jako aktivní složku obsahuje látku, schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem příbuzným parathyroidnímu hormonu (PTHrP) a jeho receptorem.
2. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle nároku 1, přičemž látkou je antagonist k receptoru pro PTHrP.
3. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle nároku 1, přičemž látkou je protilátka proti PTHrP.
4. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle nároku 1, přičemž látkou je fragment protilátky proti PTHrP a/nebo modifikovaná forma fragmentu.
5. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle nároku 3 nebo 4, přičemž protilátkou je polidštěná nebo chimerická protilátka.
6. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle nároku 5, přičemž polidštěnou protilátkou je polidštěná protilátka #23-57-137-1.
7. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle nároku 3 nebo 4, přičemž protilátkou je protilátka monoklonálního typu.
8. Terapeutické činidlo na hyperkalcinemickou krizi podle jakéhokoliv nároku 1 až 7, přičemž hyperkalcinemickou krizí je hyperkalcinemická krize související s maligním nádorem.

05.03.01

PV 2000 - 4753

17/321

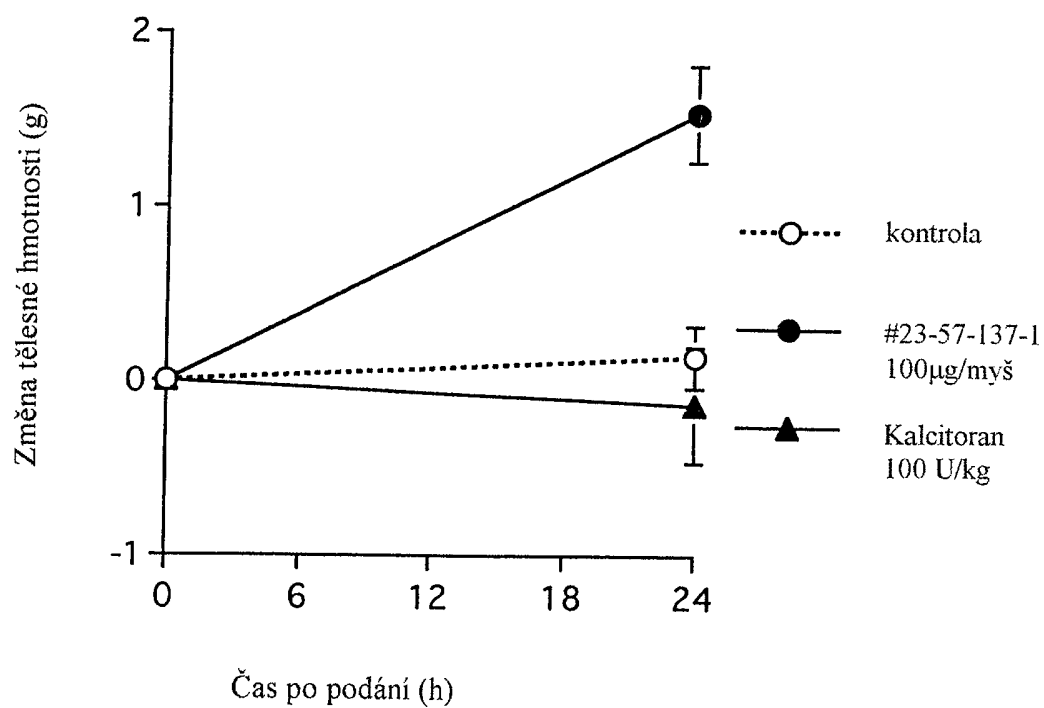
Obr. 1



05.03.01

PV 2000-4753
17/321

Obr. 2

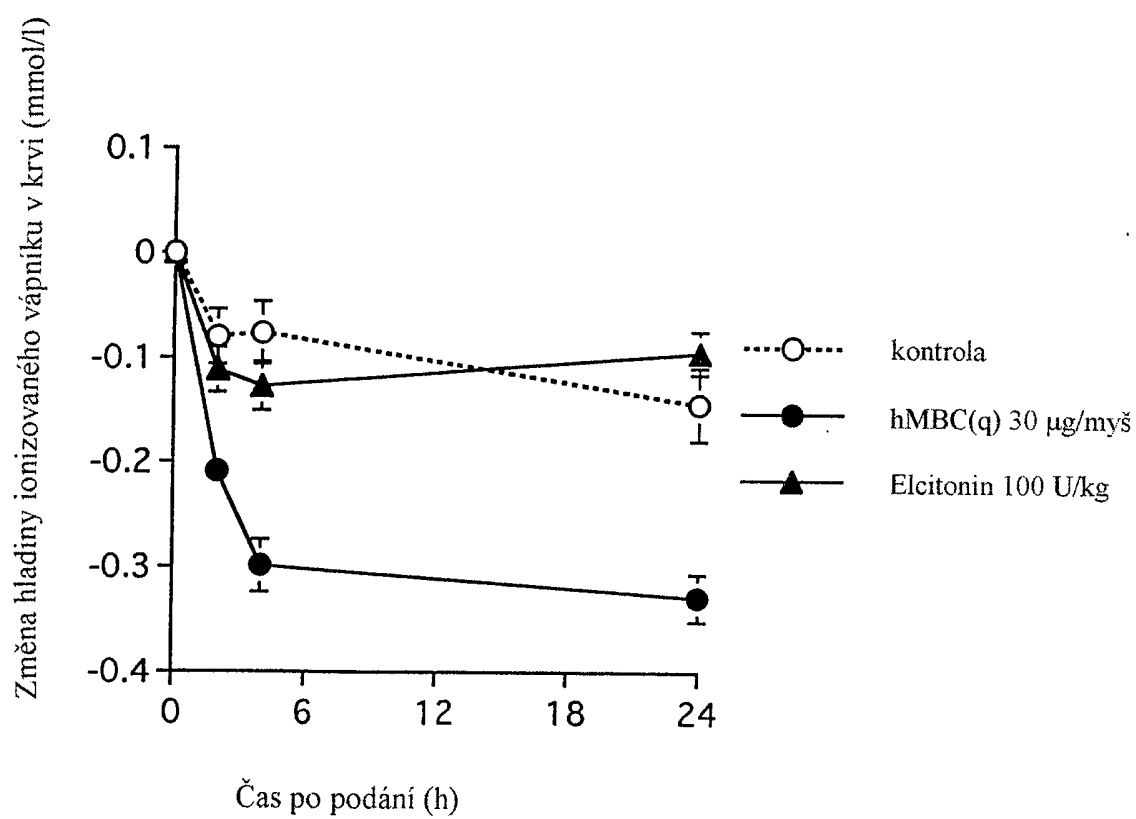


05.03.01

PV 2000-4753

17321

Obr. 3

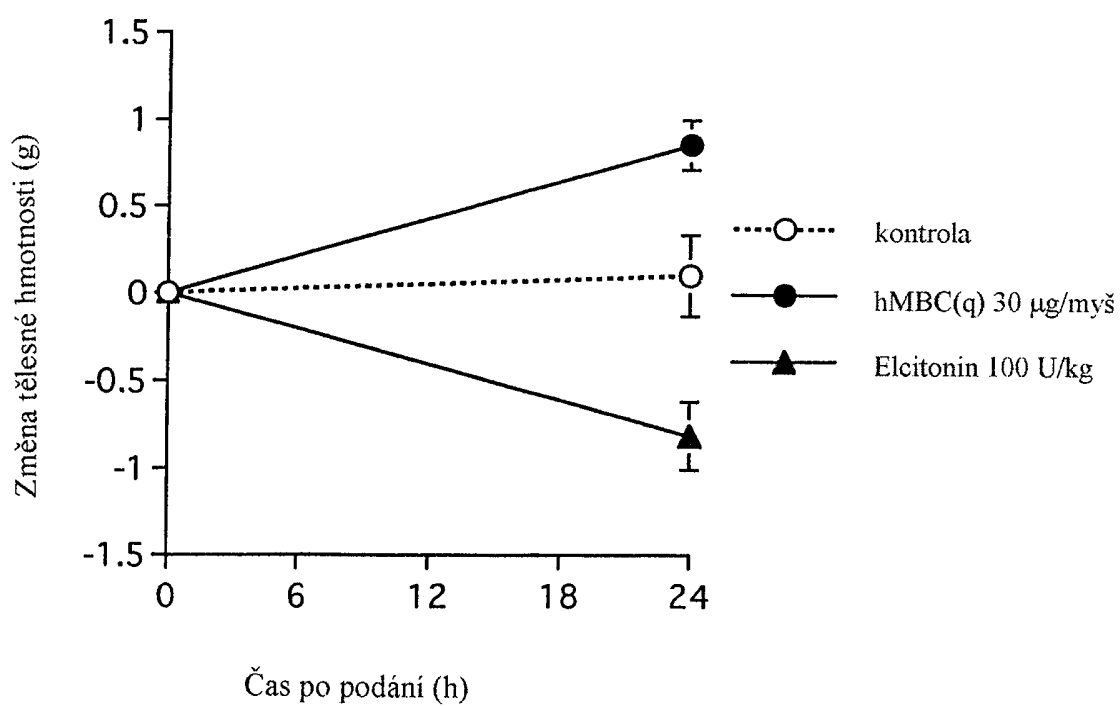


05.03.01

PV 2000-4753

17/321

Obr. 4

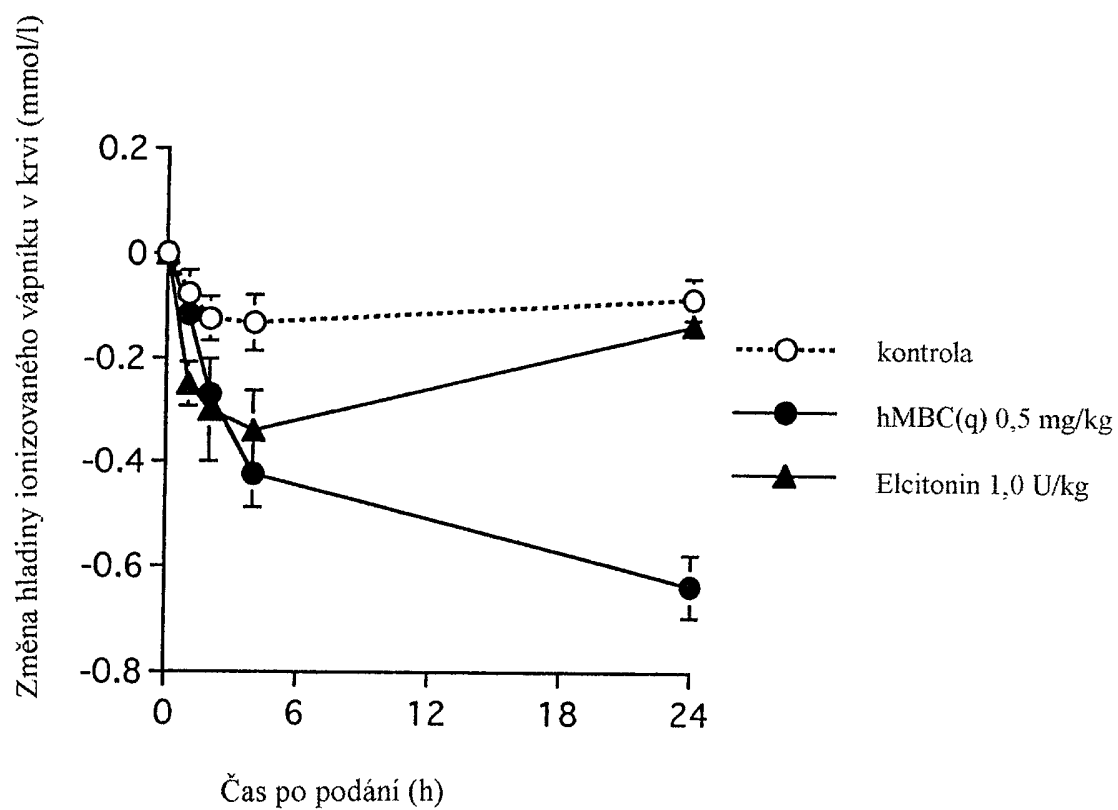


05.03.01

PV 2000 - 4753

17/321

Obr. 5



05.03.01

PV 2000-4753

14/321

Obr. 6

