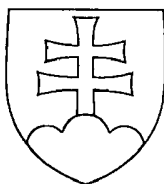


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 21.11.94
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9325182.5
(32) Dátum priority: 08.12.93
(33) Krajina priority: GB
(40) Dátum zverejnenia: 07.05.97
(86) Číslo PCT: PCT/IB94/00387, 21.11.94

(21) Číslo dokumentu:

735-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶ :

C 12N 15/13,
C 07K 16/28,
C 07K 16/46,
A 61K 39/395

(71) Prihlasovateľ: T CELL SCIENCES, INC., Needham, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Yee-Tharn Lin Augustine, Chestnut Hill, MA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Humanizovaná protilátka, spôsob jej výroby, jej použitie a farmaceutické prostriedky na jej báze**

(57) Anotácia:

Humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín, ktorá je schopná sa viazať na T-bunky, vykazujúce mimoriadne variabilné β reťazce, a predovšetkým na subpopulácie exprimujúce humánne V β 5.2 a/alebo 5.3 a V β 8.1, spôsob jej výroby, jej použitie a farmaceutické prostriedky na jej báze.

Humanizovaná protilátka, spôsob jej výroby, jej použitie a farmaceutické prostriedky na jej báze

Oblasť techniky

Vynález sa týka humanizovaných protilátok a ich väzbových proteínov, ktoré sú schopné sa naviazať na T-bunky vykazujúce špecifické variabilné beta reťazce, predovšetkým subpopulácií exprimujúcich humánny Vbeta 5.2 a/alebo 5.3 a Vbeta 8.1. Vynález sa tiež týka spôsobu výroby týchto protilátok, farmaceutických prostriedkov, ktoré ich obsahujú a terapeutických aplikácií týchto protilátok, predovšetkým pri autoimunitných chorobách.

Doterajší stav techniky

T-bunky majú kľúčovú úlohu pri diferenciácii a regulácii efektorových mechanizmov v imunitnom systéme (Paul et al., (1987) Science, 195: 1293 až 1300). Pokiaľ ide o T-bunky, musia byť presne regulované korektníci antigénu a hlavnej molekuly pre histokompatibilitu, keďže nesprávna imunitná regulácia vyvoláva autoimunitu. Niekoľko laboratórií študovalo choroby, pri ktorých sa zdá byť imunitná regulácia nesprávna, ako je to v prípade autoimunity a tiež niektoré formy imunodeficiencie a došlo k záveru, že na patogenéze týchto chorôb majú účasť T-bunky.

Existuje niekoľko situácií, pri ktorých bolo oznámené, že dochádza ku klonálnej alebo oligoklonálnej expanzii receptorov T-buniek s konkrétnym zložením. Ako najzrejmšie príklady je možné uviesť malígne stavy vyvolávajúce leukémiu alebo lymfómy, na ktorých majú účasť T-bunky. Pri T-bunkových leukémiách alebo lymfómoch receptor T-buniek funguje ako jedinečný nádorový markér, keďže je stabilne prešmyknutý a je prítomný na povrchu tejto bunky. Z iných situácií, pri ktorých je implikované zloženie receptora T-bunky je možné uviesť situáciu príjemcu transplantovaného orgánu, ktorého T-lymfocyty obsahujú T-bunková receptory, ktoré ich robia agresívnymi voči MHC molekulám

donorového subjektu, ako je to napríklad v prípade darcu kostnej drene.

Dôležitejšie je, že mnohé skupiny oznámili využitie selektívneho génu s oblasťou V pre receptor antigénu T-bunky pri určitých autoimunitných situáciách. Tak napríklad Grunwald et al. pozorovali prednostnú expresiu Valfa 2.3 génového produktu v CD4+ T-bunkách v broncheoalveolárnom výplachu v porovnaní s lymfocytmi periférnej krvi pacientov so sarcoidosis (Grunwald et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22: 129). Pri Kawasakiho chorobe bola na začiatku pozorovaná prednostná expanzia Vbeta 2 a Vbeta 8 T-buniek (Abe et al. (1992) Proc. Natl. Sci. USA, 89: 4066).

V tejto súvislosti bola tiež obširne študovaná reumatoidná artritída. Niekoľko vedcov si všimlo prednostnú expanziu podsúborov T-buniek, ako napríklad: DerSimonian et al. (1993) J. Exp. Med. 117: 1623 (prednostná expanzia T-buniek nesúcich Valfa 12.1 v CD8+ T-lymfocytoch periférnej krvi); Stamenkovic et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1179 (T-bunky infiltrujúce do synoviálnej membrány pestovanej v IL-2 sú podľa analýzy Southern-blot oligoklonálne); Paliard et al. (1991) Science 253: 34 (autori uvádzajú hypotézu, že Superantigén aktivuje v beta 14+ T-bunky, vrátane autoreaktívnych T-buniek, ktoré expandujú klonálne a migrujú do synoviálnej tekutiny pacientov postihnutých reumatoidnou artritídou; Howell et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 01921 (autori si predovšetkým všimli využitie génu s V oblasťou Vbeta 3, 14 a 17 T-bunky v IL-2R+ bunkách zo synoviálnej tekutiny pacientov postihnutých reumatoidnou artritídou); Uematsu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8534 (autori poukázali na využitie génu s V oblasťou oligoklonálnej T-bunky v T-bunkách v synoviálnej tekutine jedného pacienta postihnutého reumatoidnou artritídou); medzinárodná patentová prihláška PCT W090/06758 (v tejto publikácii je implikovaný Vbeta 3, 9 a 10 pri reumatoidnej artritíde).

Tiež bola obširne študovaná inflamatórna choroba čriev. Niekoľko skupín vedcov si všimlo expandované populácie T-buniek

alebo prednostné využitie génu s V oblasťou receptora T-bunky a to v týchto prípadoch: Posnett et al., (1990) J. Clin. Invest. 85:1770; Spercer et al., (1991) J. Clin. Pathol. 44: 915; Trejdosiewicz et al., (1991) Clin. Exp. Immunol. 84: 440 a Van Kerckhove et al., (1992) J. Exp. Med. 175: 57. Ešte ďalší vedci oznámili prednostné využitie V génu T-bunky v Mycobacterium leprae (van Shooten et al. (1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:11244; Want et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 188.

Pokiaľ ide o človeka, bola expanzia Vbeta 8.1 T-buniek v inflamatórnom tkanive zistená v spojení s rôznymi autoimunitnými chorobami, ako je napríklad Crohnova choroba (Posnett et al. (1990) J. Clin Invest., 85: 1770 až 1776), Kawasakiho choroba (Abe et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4066 až 4070 a Abe et al. (1993) J. Exp. Med. 177: 791 až 796) a reumatoidnou artritídou (Brennan et al. (1988) Clin Exp. Immunol. 73: 1417 až 1423).

Ďalšia autoimunitná choroba, ktorá bola rozsiahle študovaná, je roztrúsená skleróza. Roztrúsená skleróza je choroba sprostredkovaná imunitou, ktorá je charakterizovaná infiltráciou a demyelizáciou jednojadrových buniek centrálného nervového systému. Napriek tomu, že je patogenéza roztrúsenej sklerózy neznáma, sú pri tomto chorobnom procese implikované ako genetické faktory, tak aj faktory prostredia. Hlavné prvky genetickej predispozície zahŕňujú asociáciu tejto choroby s určitou triedou II haplotypov hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) a predovšetkým HLA-DR21 a DQw1 (Terasiad et al. (1976) Science 193: 1245 až 1247; Ho et al. (1982) Immunogenetics 15: 509 až 517; Spielman et al. (1982) Epidemiol. Rev. 4: 45 až 65; Francis et al. (1986) Lancet 1: 211; Elian et al. (1987) Disease Markers 5: 89 až 99; Urban et al. (1988) Cell 54: 577 až 592; Vandenbark et al. (1989) Nature, 341: 541 až 544; Howell et al. (1989) Science 246: 668 až 670).

Bolo dokázané, že T-bunky izolované z cerebrospinálnej tekutiny pacientov postihnutých roztrúsenou sklerózou využívajú

obmedzený súbor génov s V oblasťou. Okolnosť, že boli zistené u pacientov s roztrúsenou sklerózou in vivo aktivované myelínový proteín špecifické T-bunky, naznačuje podiel MBP reaktívnych T-buniek pri patogenéze tejto choroby (Wucherpfennig et al. (1992) Science 248: 1016 až 1019). Ak sa TCR Vbeta využitie MBP reaktívnych T-bunkových línií stanovuje prostredníctvom amplifikácie cDNA s T-bunkovými receptorovými Vbeta primérmí reťazcovou reakciou s polymerázou (PCR), je pozorované prednostné využitie obmedzeného počtu Vbeta génov (Wucherpfennig et al., vyššie uvedená citácia z roku 1990) - Vbeta 17 a v menšom rozsahu Vbeta 12 sa často používa pri rozpoznávaní imunodominantnej oblasti humánneho antigénového MBP; Oksenberg et al. (1993) Nature 362: 68. Výsledky niektorých štúdií tiež ukazujú, že v mozgových léziách pacientov s roztrúsenou sklerózou dochádza k obmedzenej expresii receptorového V alfa génu T-bunky (Oksenberg et al. (1990) Nature 345: 344 až 346). Analýza repertoáru T-buniek použitím kvantitatívnej PCR a farbenia monoklonálnej protilátky (mAb) ukázala, že MBP (proteín na báze myelínu) špecifické T-bunky izolované z pacientov s roztrúsenou sklerózou využívajú prevážne Vbeta 5.2 a/alebo 5.3 v porovnaní s kontrolou (Oksenberg et al. (1993), vyššie uvedená citácia) (prešmyknutý gén Vbeta 5.2 bol detegovaný v mozgu pacientov s určitým HLA fenotypom) a Kotzin et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9196 (sklon k využitiu beta reťazec variabilnej oblasti 5.2 a v menšom rozsahu Vbeta 6.1 bol pozorovaný medzi MBP špecifickými klonmi pacientov s roztrúsenou sklerózou.

V súčasnej dobe neexistuje žiadne účinné liečenie roztrúsenej sklerózy (Harrison's Principles of Internal Medicine, 12. vydanie, ed. Wilson et al., McGraw Hill Inc. 1991). Terapeutické úsilie je zamerané na zlepšenie akútnej epizódy, prevenciu remisí alebo progresie choroby a úľavy od symptómov.

Bolo však zistené, že expresia myšacej beta reťazca variabilnej oblasti génu Vbeta 8.2 koreluje s experimentálnou alergickou encefalomyelitídou (EAE), čo je myšací model ľudskej roztrúsenej sklerózy. Bolo ukázané, že liečenie myši Vbeta 8.2

špecifickým mAb môže spôsobiť, že sa dá ako predísť tejto chorobe, tak aj znížiť jej rozsah (Acha-Orbea et al. (1988) Cell 54: 263 a Urban et al. (1988) Cell. 54: 577). Existuje teda veľká potreba vyvinúť protilátku alebo molekulu "podobajúcu sa protilátke", ktorá by bola vhodná na liečenie tejto choroby.

Protilátky obvykle obsahujú dva ťažké reťazce, ktoré sú spolu spojené disulfidovými väzbami a ľahký reťazec pripojený k N-koncu každého z ťažkých reťazcov. Každý ťažký reťazec obsahuje pri svojom N-konci variabilnú doménu, po ktorej nasleduje konštantná doména pri jeho druhom konci. Každý ľahký reťazec tiež obsahuje pri N-konci variabilnú doménu, po ktorej nasleduje konštantná doména. Variabilné domény každej dvojice ľahkého a ťažkého reťazca vytvárajú väzbové miesto pre antigén. Variabilné domény v ľahkom a ťažkom reťazci majú rovnakú všeobecnú štruktúru a každá doména zahŕňa základnú štruktúru skladajúcu sa z štyroch oblastí, ktorých sekvencie sú relatívne konzervované, ktoré sú spojené tromi oblasťami určujúcimi komplementaritu (CDR). Rámec štyroch oblastí trochu naberá konformáciu betalistu a CDR vytvárajú slučky spájajúce konštrukciu betalistu. CDR sú udržiavané v tesnej blízkosti oblastí základnej štruktúry a prispievajú k vytvoreniu väzbového miesta pre antigén. Jednotlivé oblasti CDR a základné štruktúry protilátok je možné stanoviť použitím Kabatovho počítačového systému (Kabat et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office) v spojení s röntgénovou kryštalografiou popísanou vo WO 91/09967.

Na produkciu protilátky, ktorá môže byť zameraná na špecifický antigén, sa obvykle používa postup popísaný Kohlerom a Milsteinom (Kohler et al., (1976) Nature 256: 495 až 497). Tento postup vo všeobecnosti zahŕňa imunizáciu myši antigénom, fúziu slezinných buniek imunizovanej myši s bunkami myšacieho myelomu a selekciu takto vzniknutých hybridómov, pri ktorej sa hľadá jeden alebo viac hybridómov vylučujúcich monoklonálnu protilátku špecifickú na cieľový antigén.

Bolo by žiadúce používať takéto mAb pri liečení. Takéto mAb majú však v podstate myšací pôvod a sú preto samé o sebe v človeku antigénne. Ak sa takéto mAb opakovane podajú človeku, imunitný systém človeka vytvorí na myšacom mAb odpoveď, ktorá ho dezaktivuje.

Preto bolo navrhnuté (pôvodne Winterom a jeho spolupracovníkmi) (pozri napríklad Reichmann et al. (1988), Nature, 332: 323 až 327 a Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534 až 1536), aby boli oblasti CDR myšacej mAb vštepene na humánnu základnú štruktúru s cieľom získania CDR-štepenej protilátky vykazujúcej väzbové vlastnosti donorovej myšacej mAb a humánnu kompatibilitu akceptora humánnej základnej štruktúry.

Funkcia molekuly protilátky je však závislá od jej trojrozmernej štruktúry a táto štruktúra je závislá od jej primárnej aminokyselinovej sekvencie. Zmeny aminokyselinovej sekvencie protilátky môžu nepriaznivo ovplyvniť jej aktivitu. Podobne fragmenty protilátky si nemusia zachovať vhodnú trojrozmernú štruktúru, ktorá je potrebná na stimuláciu väzbovej aktivity. Okrem toho, zmena sekvencie DNA kódujúcej protilátku môže ovplyvniť schopnosť bunky obsahujúcej túto sekvenciu DNA exprimovať, vylučovať alebo zhromažďovať protilátky. Presné zvyšky zahrnujúce oblasti CDR je ťažké definovať a nemusia nutne zodpovedať všetkým zvyškom hypervariabilných oblastí podľa definície použitím Kabatovho systému číslovania. Tiež existujú rozhodujúce zvyšky základnej štruktúry, ktoré sú dôležité pre umiestenie oblastí CDR pri interakcii s antigénom alebo ktoré majú účasť na interakciách s antigénom alebo ktoré majú účasť na interakciách medzi ťažkým a ľahkým reťazcom. Môže byť potrebné určité zvyšky základnej štruktúry zmeniť tak, aby zodpovedali donorovým zvyškom v určitých polohách, čím sa CDR-štepenej protilátke dodá "menej humánnu charakter".

Boli publikované rôzne návrhy na identifikáciu zvyškov CDR a základnej štruktúry, ktoré je potrebné zmeniť na donorové zvyšky, aby sa získala užitočná CDR-štepená protilátka (pozri napríklad

Queen et al., WO 90/07861; Kurrle et al., EP-A-0 403 156; AdaIR ET AL., WO 91/09967, Queen et al. WO/82/11018 a Bendig et al. WO 92/01568). Z týchto dokumentov vyplýva, že produkcia užitočnej CDR-štepenej protilátky nie je v žiadnom prípade nijako jednoduchá. Napriek problémom, ktoré sú vlastné pokusom o produkciu špecifickej CDR-štepenej protilátky, sa pôvodcom podarilo získať CDR-štepenú protilátku založenú na oblastiach humánnej základnej štruktúry, ktorá obsahuje väzbové miesto pre antigén, ktoré je špecifické pre variabilné oblasti beta reťazca, ktoré sú zvláštne pre určité subpopulácie T-buniek. S prekvapením sa zistilo, že humanizované protilátky podľa vynálezu vykazujú rovnako dobrú alebo lepšiu väzbovú afinitu k cieľovým T-bunkám v porovnaní s ich myšacími prototypmi. Protilátky nárokované v tomto dokumente alebo ich časti poskytujú ďalšiu výhodu v zníženej imunogenicite v porovnaní s myšacími prototypmi, čo sa prejavuje znížením nepriaznivých reakcií pacienta pri použití v terapii.

Podstata vynálezu

Vynález je zameraný na humanizované protilátky vykazujúce selektívnu väzbovú špecificitu pre určité subpopulácie T-buniek. Pri väzbe k týmto subpopuláciám sú tieto protilátky vysoko citlivé a špecifita a afinita pri tejto väzbe je porovnateľná alebo lepšia v porovnaní s prototypovými monoklonálnymi protilátkami (mAb), z ktorých je odvodená podstatná časť CDR oblastí. Vynález je zameraný tiež na spôsoby výroby takýchto humanizovaných protilátok použitím novej cDNA kódujúcej určité hypervariabilné zvyšky a zvyšky základnej štruktúry, ktorá je vštepená do základnej štruktúry humánneho ťažkého reťazca a humánneho ľahkého reťazca. Ďalej je vynález tiež zameraný na farmaceutické prostriedky a spôsoby liečby použitím týchto protilátok.

Podľa jednej realizácie vynálezu, ktorému sa dáva osobitná prednosť, bola myšacia monoklonálna protilátka 16G8, ktorá rozpoznáva humánny beta reťazec Vbeta 8.1, humanizovaná CDR

vštepéním určitej CDR a vybraných zvyškov základnej štruktúry z myšacej mAb do základnej štruktúry ťažkého reťazca KOL a ľahkého reťazca REI. cDNA kódujúca humanizovaný ťažký reťazec (IgG1) a ľahký reťazec (K) vo vektoroch pre expresiu v cicavčích bunkách so selekčnými markérmí Neo a DHFR boli boli transfekované do bunkovej línie DHFR-fibroblastov čínskeho chrčka (CHO) a potom nasledovala selekcia a amplifikácia. Vylúčená humanizovaná mAb, označená názvom "TM29" si zachováva špecificitu voči humánnym TCR Vbeta 8.1 s afinitou porovnateľnou s afinitou prototypovej myši mAb (16G8). Protilátky podľa vynálezu ukázali, že humanizácia anti-TCR sa môže dosiahnuť pri zachovaní správnej špecificity a afinity charakteristickej pre túto podmnožinu.

Ďalším aspektom tohto vynálezu je použitie týchto humanizovaných protilátok ako terapeutické činidlo na liečenie humánnych autoimunitných chorôb, predovšetkým Crohnovej choroby.

Pri ďalšej realizácii tohto vynálezu, ktorému sa dáva osobitná prednosť, bola myšacia mAb, TM23, ktorá rozpoznáva humánnu Vbeta 5.2 a 5.3, humanizovaná CDR štepéním do základnej štruktúry ťažkého reťazca NEWM a ľahkého reťazca REI. cDNA kódujúca humanizovaný ťažký reťazec (IgG1) a ľahký (K) reťazec v expresných vektoroch z cicavčích buniek so selekčnými markérmí Neo (ťažký reťazec) a DHFR (ľahký reťazec) boli transfekované do bunkovej línie CHO z DHFR-fibroblastov čínskeho chrčka a potom nasledovala selekcia a amplifikácia. Vylučovaná humanizovaná mAb bola označená názvom "TM27" a zachová si špecificitu voči humánnemu TCR Vbeta 5.2 a 5.3 s afinitou, ktorá je porovnateľná a lepšia ako pokiaľ ide o prototypovú myšaciu mAb (TM23). Ďalšie aspekty vynálezu zahŕňujú použitie TM27 ako terapeutického činidla pri liečení humánnej roztrúsenej sklerózy.

Prehľad obr. na výkresoch

Na obr. 1 sú znázornené rôzne variabilné sekvencie reťazca a sekvencie ťažkého reťazca TM27.

Na obr. 2 sú znázornené rôzne variabilné sekvencie ťažkého reťazca TM29.

Obr. 3 ukazuje výsledky kompetitívnej skúšky, pri ktorej sa porovnáva TM271/NSO a TM27L/CHO s 4H11.

Na obr. 4 je znázornený Scatchardov graf experimentu vzťahujúci sa na experiment znázornený na obr. 3.

Nasleduje podrobný popis tohto vynálezu, pričom najprv sú uvedené definície niektorých pojmov, ktoré sa v tomto popise používajú.

Pod pojmom "protilátka" sa rozumejú imunoglobulíny (Ig) alebo ich fragmenty, monoméry alebo diméry ľahkých reťazcov alebo ťažkých reťazcov a jednoreťazcové protilátky, ako je jednoreťazcový Fvs, v ktorom sú domény ľahkého a ťažkého reťazca spojené peptidovým linkérom. Môže ísť o prírodné protilátky alebo o protilátky získané pomocou technológie rekombinácie DNA alebo iných spôsobov. Protilátka musí obsahovať aspoň jedno väzbové miesto pre antigén. Zvyšok protilátky nemusí obsahovať len proteínové sekvencie odvodené z Ig. Tak napríklad, môže byť skonštruovaný gén, v ktorom je sekvencia DNA kódujúca časť humánneho Ig reťazca fúzovaná k sekvencii DNA kódujúcej aminokyselinovú sekvenciu molekuly polypeptidového efektora alebo reportéra. Do rozsahu pojmu "protilátka" teda patria aj hybridné protilátky (pozri ďalej).

Pojem "väzbový proteín" sa používa pre konštrukt s určitou aminokyselinovou sekvenciou odvodenou z protilátky alebo kombinácie protilátok, pričom táto sekvencia má takú stérickú konfiguráciu, že vytvára prinajmenšom jedno väzbové miesto pre antigén.

Skratka "mAb" sa používa na označenie monoklonálnej protilátky produkovanej hybridomálnou alebo derivátovou bunkovou líniou.

Pod označením "rekombinantná protilátka" sa rozumie protilátka získaná spôsobom, pri ktorom sa používa rekombinantná DNA technológia.

Označenie "CDR" alebo "oblasť určujúca komplementaritu" sa vzťahuje na časti variabilných oblastí ťažkého a ľahkého reťazca protilátky, ktoré sú umiestené nad sebou v trojrozmernom priestore za vzniku povrchu viažuceho antigén.

Pod označením "chimerická protilátka" sa rozumie protilátka, v ktorej sú variabilné domény, ako celok, odvodené z protilátky z jedného cicavčieho druhu a sú fuzionované k aspoň jednej konštantnej doméne z protilátky z iného cicavčieho druhu.

Označenie "CDR štepený" sa používa pre popis protilátky alebo jej časti, v ktorej sú oblasti CDR v podstate odvodené z protilátky z pravého cicavčieho druhu vštepené na variabilné oblasti základnej štruktúry v podstate odvodené z druhého cicavčieho druhu. Niektoré vybrané aminokyseliny v týchto oblastiach základnej štruktúry môžu byť tiež odvodené z prvého cicavčieho druhu.

Označenie "hybridná protilátka" sa používa pre popis proteínu obsahujúceho prinajmenšom väzbovú časť Ig pripojenú peptidovou väzbou na aspoň časť iného proteínu. Niektorí odborníci môžu na popis takýchto konštruktov používať tiež prívlastky "chimerický", ale v tomto popise sú vyššie uvedené konštrukty označované názvom "hybridné protilátky" a termín "chimerické protilátky" sa používa vo vyššie definovanom zmysle.

Označenie "humanizovaná protilátka" sa používa na popis protilátky, v ktorej je aspoň jedna a prednostne dve alebo tri oblasti CDR jednej alebo dvoch variabilných domén, odvodená z protilátky z prvého druhu (pričom sa rozumie, že tu môžu byť zahrnuté určité vybrané aminokyseliny základnej štruktúry v spojení s určitými hypervariabilnými aminokyselinovými

sekvenciami). Zvyšné časti protilátky odvodené z Ig sú odvodené z jednej alebo viacerých rôznych protilátok. Variabilné domény môžu byť skonštruované použitím rekombinantnej DNA technológie alebo pomocou peptidovej syntézy.

Pod označením "expresný vektor" sa rozumie vektor, ktorý je schopný exprimovať sekvencie DNA v ňom obsiahnuté, t.j. v ktorom sú kódujúce sekvencie operabilne pripojené k iným sekvenciám, ktoré sú schopné ich exprimovať. Užitočná, ale nie vždy nutná (napríklad pokiaľ ide o hmyzie bunky) časť efektívneho expresného vektora je sekvencia kódujúca markér, t.j. sekvencia kódujúca sekvenciu vektora majúca za následok vznik určitej fenotypovej vlastnosti (napríklad rezistencie voči neomycínu, rezistencie voči metionínsulfoximínu alebo tryptofánové prototrofie) buniek obsahujúcich tento proteín, čo umožňuje ľahkú identifikáciu takýchto buniek. Súhrnne sa dá povedať, že pojem "expresný vektor" predstavuje funkčnú definíciu a do jeho rozsahu patrí akákoľvek sekvencia DNA, ktorá je schopná zaistiť expresiu špecificky obsiahnutého DNA kódu. V súčasnosti sú takéto vektory často vo forme plazmidu. Označenie "plazmid" a "expresný vektor" sa často používa zameniteľne. Do rozsahu tohto vynálezu však spadajú aj iné formy expresných vektorov ako plazmidy, ktoré slúžia na rovnaké funkcie a ktoré sú niekedy v tomto obore známe, ako sú retrovírusy, adenovírusy, in vitro systémy (Baranov et al. (1989), Gene 84: 2: 463) a pod.

Ako už bolo uvedené vyššie, sekvencie DNA budú exprimované v hostiteľských bunkách po tom, ako budú operabilne pripojené (t.j. umiestené tak, aby sa zaistila ich funkcia) k sekvencii riadiacej expresiu. Tieto expresné vektory sú obvykle replikovateľné v hostiteľských organizmoch buď ako epizómy alebo ako integrálna časť hostiteľskej chromozomálnej DNA.

Pod označením "rekombinantné hostiteľské bunky" sa rozumejú bunky transformované vektormi skonštruovanými použitím rekombinantných DNA technológií. Vďaka takejto transformácii sú hostiteľské bunky schopné produkovať požadovaný produkt v

užitočných množstvách a nie v príliš nízkych množstvách, alebo - obvyklejšie - v množstvách pod hranicou v netransformovanom hostiteľovi. Protilátku a väzbové proteíny podľa vynálezu môžu rekombinantné hostiteľské bunky produkovať v množstvách umožňujúcich ďalšie experimenty alebo v obchodne vhodných množstvách, ako je asi 100 g alebo viac.

Pri popise spôsobov protilátok alebo ich väzbových proteínov z rekombinantných hostiteľov sa pojmy "bunka" a "bunková kultúra" používajú zameniteľne na označenie zdroja protilátky, pokiaľ nie je jasne uvedené niečo iné. Inými slovami, izolácia z "buniek" môže znamenať buď izoláciu z celých odstredených buniek alebo z bunkovej kultúry, ktorá obsahuje médium so suspendovanými bunkami alebo tiež prídavne, ako je to v prípade myelómových bunkových línií, z kultúry ascites.

Humanizované protilátky alebo ich väzbové proteíny podľa tohto vynálezu obsahujú aminokyselinové sekvencie zahrnujúce všetky CDR alebo ich časť CDR, s tým, že boli v podstate odvodené z monoklonálnej protilátky vykazujúcej špecificitu pre vybranú subpopuláciu T-buniek a predovšetkým pre subpopuláciu Vbeta 8.1 alebo Vbeta 5.2/5.3. V prednostnej realizácii má táto monoklonálna protilátka myšací pôvod. Aminokyselinové sekvencie základnej štruktúry variabilných domén protilátok alebo ich častí majú v prednostnej realizácii v podstate humánnu pôvod a preto sa používajú pre tieto protilátky označenia "humanizované protilátky". Predpokladá sa, že "humanizácia" je užitočný prostriedok na zníženie imunogenicity protilátky pri terapeutickom podávaní humánnym pacientom. Prednostne sa v tomto prípade používajú oblasti humánnej základnej štruktúry NEWM alebo KOL, v prípade ťažkého reťazca a oblasti humánnej základnej štruktúry REI, v prípade ľahkého reťazca. Určité zvolené zvyšky v základnej štruktúre sú zachované z myši a nepochádzajú teda z človeka. Predpokladá sa, že je to nutné kvôli dosiahnutiu vhodnej trojrozmernej štruktúry molekuly a teda kvôli zvýšeniu väzbovej špecificity a afinity pre špecifickú podmnožinu T-buniek.

Do rozsahu tohto vynálezu patria akékoľvek časti humanizovaných protilátok (preto je definícia termínu "protilátka" tak široká) získaných na základe týchto poznatkov, ak je pre ne zachovaná väzbová špecificita a afinita pre vybrané subpopulácie T-buniek. Do rozsahu tohto vynálezu teda samozrejme patria väzbové proteíny pochádzajúce z týchto protilátok, rovnako tak, ako aj iné fragmenty, ktoré si uchovávajú tieto schopnosti, prinajmenšom v stupni postačujúcom na terapeutické použitie, ako je to popísané ďalej.

Odborníci v tomto obore môžu vyskúšať väzbové parametre rôznych konštruktov zhotovených na základe tu popísaných poznatkov použitím konvenčných väzbových skúšok uskutočnených so špecifickými T-bunkami alebo receptorovými proteínmi T-buniek vykazujúcimi zvolenú variabilnú oblasť, predstavujúcu terč. Tak napríklad je možné uskutočniť kompetetívne väzbové skúšky s prototypovými mAb viažúcimi sa k rôznym bunkovým líniám, Scatchardové analýzy a pod. a výsledky porovnať s výsledkami získanými použitím prototypových mAb. Aby sa zistila terapeutická účinnosť konštruktov zhotovených podľa vynálezu, je možné sa alternatívne uchýliť k rôznym zvieracím modelovým systémom (ktoré sú popísané ďalej) alebo klinickým štúdiám. Je samozrejmé, že konštrukt môže byť veľmi vhodné terapeutické činidlo aj keď sa jeho väzbový profil k cieľovému antigénu odlišuje do väzbového profilu prototypovej mAb. V prednostných realizáciách zahrnuje aminokyselinová sekvencia humanizovanej protilátky alebo jej väzbového proteínu celý variabilný ľahký reťazec alebo jeho časť zvolenú zo súboru zahrnujúceho:

Ľahký reťazec TM 29

```

1  DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVNYIYWYQQTPGKAPKLLIYYT  50
51  SNLAPGVPSRFRSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIATYYCQQFTSSPFTFGQG 100
101 TKLQIT 106

```

a jeho časti;

ľahký reťazec TM 27

```

1   DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNYLNHWYQQTPGKAPKLLIYY   50
51  TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFISLQPEDIATYYCQQYSKLPRTFGQ  100
101 GTKLQIT                                                    107

```

a jeho časti;

samé alebo v kombinácii s celým variabilným ťažkým reťazcom alebo jeho časťou zvolenou zo súboru zahrnujúceho:

ťažký reťazec TM29

```

1   EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAY   50
51  ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARRG  100
101 EGAMDYWGQGTPVTVSS                                       117

```

a jeho časti a

ťažký reťazec TM27

```

1   QVQLQESGPGLVRRPSQTLSTCTVSGFSLTAYGVNHWVRQPPGRLGLEWLG  50
51  IWGDGNTDYNALKSRVTMLKDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV  100
101 TATLYAMDYWGQGS�VTVSS                                       120

```

a jeho časti.

Zvolené zvyšky základnej štruktúry v susedstve jednotlivých CDR sú dôležité na podoprenie trojrozmernej konformácie týchto CDR (Foote a Winter (1992) J. Mol. Biol. 224: 487 až 499). V niektorých prednostných realizáciách boli teda skonštruované modifikované ťažké reťazce. V prvom takom prípade boli zvyšky 66 až 69, vrátane a 73 myšacieho pôvodu, t.j. myšacie sekvencie Leu-Ser-Ile-Ser (66 až 69) a Asp (73), zavedené namiesto príslušných ľudských zvyškov.

V iných prednostných realizáciách boli zavedené myšacie zvyšky valínu a fenylalanínu do polôh 78 a 79 alebo myšací

arginínový zvyšok do polohy 92.

Na obr. 1 sú uvedené príklady týchto substitúcií. Oblasti CDR sú uvedené hrubo a sú podtrhnuté. Tieto prednostné protilátkové konštrukty (vrátane ich väzbových proteínov) sa viažu k Vb 5.2/5.3.

Iné prednostné protilátky a ich väzbové proteíny podľa vynálezu vznikajú modifikáciou ťažkých reťazcov v zvyškoch 23 a 24. Do týchto polôh sa zavádza myšacia sekvencia Ala-. V iných konštruktoch môže byť zvyšok 75 myšací prolínový zvyšok alebo zvyšky 88, 89 a 91 môžu byť myšacie zvyšky alanínu, metionínu a tyrozínu. Tieto protilátkové konštrukty a ich väzbové proteíny viažu T-bunky Vbeta 8.1 a sú podrobnejšie znázornené na obr. 2.

V použití podľa vynálezu sa dáva prednosť predovšetkým CDR štepeným protilátkam, ktoré sa v podstate skladajú z ľahkého reťazca TM27 v spojení s ťažkým reťazcom TM27, pričom zvyšok 48 je buď leucín alebo izoluecín. Tiež sa dáva prednosť predovšetkým CDR štepeným protilátkam, ktoré sa v podstate skladajú z ľahkého reťazca TM29 v spojení s ťažkým reťazcom TM29.

Humanizované protilátky alebo ich väzbové proteíny podľa vynálezu je možné získať pomocou rôznych technológií, pričom najväčšia prednosť sa dáva expresii v transfekovaných bunkách, ako napríklad kvasinkových bunkách, bunkách hmyzu, bunkách CHO alebo myelómových bunkách. Najvýhodnejšia hostiteľská bunka je bunka CHO.

Pri konštrukcii CDR štepenej protilátky alebo jej väzbového proteínu podľa vynálezu je najprv nutné zistiť sekvenciu variabilnej domény protilátky, ktorá má požadované väzbové vlastnosti. Vhodnými zdrojmi buniek pre takéto sekvencie DNA sú vtáci, cicavci alebo iné stavovce, ako napríklad kurčatá, myši, potkany a kráľci, prednostne však myši. Sekvencie variabilných domén (V_H a V_L) je možné stanoviť z cDNA ťažkého a ľahkého reťazca syntetizovaných z príslušných mRNA pomocou technológií

známych v tomto obore. Pomocou Kabátovej metódy (pozri vyššie) je potom možné určiť hypervariabilné oblasti. Oblasti CDR je možné určiť pomocou štruktúrnej analýzy použitím röntgenovej kryštalografie alebo pomocou techník molekulárneho modelovania. Potom sa dá skonštruovať kompozitné CDR obsahujúce všetky zvyšky zodpovedajúce hypervariabilným oblastiam spolu s určitými zvolenými zvyškami z oblasti základnej štruktúry. Výsledné kompozitné CDR je možné potom preniesť ako "väzbové miesto pre antigén", zatiaľ čo zvyšok protilátky (ak to je žiadúce, aby bol skonštruovaný úplný Ig) bude zahrňovať konštantné domény ťažkého a ľahkého reťazca a zvyšné zvyšky základnej štruktúry. Posledné uvedené časti môžu byť založené na humánnych protilátkach z rôznych tried.

Konštantné domény môžu byť zvolené tak, aby mali požadované efektorové funkcie vhodné na zamýšľané použitie takto skonštruovaných protilátok. Tak napríklad humánne IgG izotypy IgG₁ a IgG₃ sú účinné pri úplnej fixácii a lýze sprostredkovanvej bunkami. Na iné ciele môžu byť vhodnejšie iné izotypy, ako napríklad IgG₂ a IgG₄ alebo iných tried, ako IgM a IgE.

Na humánnu terapiu sú osobitne vhodné humánne izotypy, aby sa minimalizovala odpoveď počas liečenia. Sekvencie DNA humánnej konštantnej domény, prednostne v spojení s inými oblasťami základnej štruktúry variabilnej domény, je možné pripraviť pomocou všeobecne známych postupov. Ako príklad je možné uviesť CAMPATH 1H, ktorý je dostupný od firmy Borroughs Wellcome Ltd.

Pri prednostných realizáciách tohto vynálezu sa pripravujú určité CDR štepené protilátky, ktoré obsahujú zvolené alterácie v oblasti humánnej základnej štruktúry (inými slovami vonku z oblastí CDR variabilných domén), čo vedie k CDR štepeným protilátkam s uspokojivou väzbovou afinitou. Táto väzbová afinita prednostne leží v rozmedzí od asi 10^{-5} .M do asi 10^{-12} .M a prednostne je aspoň asi 10^{-8} .M. Väzbová afinita je prednostne približne rovnaká alebo vyššia ako väzbová afinita prototypovej protilátky (v prednostných prípadoch je táto prototypová

protiľátka myšacia protiľátka).

Pri konštrukcii CDR štepených protiľátok podľa vynálezu sa môžu V_H a/alebo V_L génové segmenty alternovať mutagenézou. Odborníkom v tomto obore je zrejmé, že podobným spôsobom sa dajú tiež alternovať iné nukleotidy kódujúce aminokyselinové zvyšky alebo sekvencie obsiahnuté v časti Fc alebo iných oblastiach protiľátky (pozri napríklad PCT/US89/00297).

Ako príklady vhodných techník je možné uviesť adíciu, deléciu alebo nekonzervatívnu substitúciu obmedzeného počtu rôznych nukleotidov alebo konzervatívnu substitúciu mnohých nukleotidov, za predpokladu, že sa zachová správny čítací rámeč.

Ku konečnému konštruktú je teda možné dospieť pomocou substitúcie, delécie, insercie alebo akýchkoľvek kombinácií týchto postupov. Vzhľadom na to, že existuje 64 možných sekvencií kodónu, ale len 20 známych aminokyselín, je genetický kód degenerovaný v tom zmysle, že odlišné kodóny môžu poskytnúť rovnakú aminokyselinu. Kód je však presný pre každú aminokyselinu. Existuje teda prinajmenšom jeden kodón pre každú aminokyselinu, t.j. každý kodón poskytuje jednu určitú aminokyselinu a žiadnu inú. Je zrejmé, že počas translácie sa musí zachovať správny čítací rámeč, aby sa získala správna aminokyselinová sekvencia vo výslednom polypeptide.

Techniky adície, delécie alebo substitúcie v dopredu určených aminokyselinových miestach majúcich známu sekvenciu sú dobre známe. Ako príklady takýchto techník je možné uviesť oligonukleotidom mediovanú miestne orientovanú mutagenézu a PCR.

Oligonukleotidová miestne orientovaná mutagenéza zahŕňa v podstate hybridizáciu oligonukleotidu kódujúceho požadovanú mutáciu s jednoretazcovou DNA obsahujúcou oblasť, ktorá má byť mutovaná, pričom tento jeden reťazec sa použije ako templát na predĺženie oligonukleotidu, s cieľom získania vlákna obsahujúceho danú mutáciu. Rôzne realizácie tejto techniky sú popísané v

Zoller a Smith (1982) *Nuc. Acids. Res.* 10: 6487, Norris et al. (1993) *Nuc. Acid. Res.* 11: 5103, Zoller a Smith (1984) *DNA* 3: 479 a Kramer et al. (1982) *Nuc. Acids. Res.* 10: 6475.

PCR v podstate zahrnuje exponenciálnu amplifikáciu DNA in vitro použitím sekvenčne špecifických oligonukleotidov. Tieto oligonukleotidy môžu poprípade zavádzať alterácie sekvencie. PCR technika je popísaná v publikácii Mullis a Faloona (1987) *Meth. Enz.* 155: 335. Príklady mutagenézy použitím PCR sú popísané v Higuchi et al. 1988, *Nuc. Acids. Res.* 16: 7351, Ho et al., (1989) *Gene*, 77: 51, Ho et al., *Engineering Hybridization Restriction Genes without the Use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension*; Horton et al. (1989) *Gene* 77: 61.

Nukleotidové sekvencie podľa vynálezu, ktorá sú schopné exprimovať požadované protilátky alebo ich väzbové proteíny, je možné vytvoriť z rôznych odlišných polynukleotidov (genómovej DNA, cDNA, RNA alebo syntetických oligonukleotidov). V súčasnosti sa dáva prednosť tomu, aby polynukleotidová sekvencia obsahovala produkt fúzie cDNA a genómovej DNA. Polynukleotidová sekvencia môže kódovať rôzne zložky Ig (napríklad domény V, J, D a C). Pre konštrukciu sa dajú použiť rôzne odlišné techniky. V súčasnosti najobvyklejší spôsob zahrnuje spojenie vhodných genómových a cDNA sekvencií. Môžu sa však použiť aj sekvencie cDNA (pozri EPA-0 239 400 a Reichmann et al. (1988) *Nature* 332: 323).

Rôzne vhodné expresné vektory a hostiteľské bunky sú popísané v US-A-4 816 567.

Vektory a spôsoby, ktoré sú tu zverejnené, sú vhodné na použitie v hostiteľských bunkách zahrnujúcich široký rozsah prokaryotických a eukaryotických organizmov.

Všeobecne sa samozrejme pri klonovaní sekvencií DNA s cieľom konštrukcie vektorov vhodných na použitie podľa vynálezu dáva prednosť prokaryotickým organizmom. Osobitne užitočné sú napríklad rôzne plazmidové klonovacie vektory z *E. coli*, ako

napríklad vektory Bluescript M13 od firmy Stratagene, San Diego, Kalifornia, USA; pUC19c, prírastkové číslo génovej bunky VB 0026, pBR322 (popis pozri ďalej) a pod. Vyššie uvedené príklady sú samozrejme len ilustratívne a vynález nimi nie je obmedzený.

Na expresiu sa tiež môžu používať prokaryotické organizmy, ako sú vyššie uvedené kmene *E. coli* a kmene *Bacillus*, ako je *Bacillus subtilis*, ako aj iné enterobaktérie, ako je *Salmonella typhimurium* alebo *Serratia marcescens* a rôzne druhy *Pseudomonas*.

V spojení s týmito hostiteľmi sa všeobecne používajú plazmidové vektory obsahujúce replikovanú a kontrolnú sekvenciu odvodenú z druhu kompatibilného s hostiteľskou bunkou. Vektor obvykle nesie replikačné miesto, ako aj markérové sekvencie, ktoré sú schopné umožniť fenotypovú selekciu v transformovaných bunkách. Tak napríklad *E. coli* sa obvykle transformuje použitím niektorého z mnohých derivátov pBR322, čo je plazmid odvodený z druhu *E. coli* (Bolivar et al. (1977) Gene: pBR322 obsahuje gény pre rezistenciu voči ampicilínu a tetracyklínu, čo predstavuje jednoduchý prostriedok na identifikáciu transformovaných buniek. Plazmid pBR322, jeho potomci alebo iné mikrobiálne plazmidy, môžu tiež obsahovať, alebo môžu byť modifikované aby obsahovali, promotory, ktoré môže použiť mikrobiálny organizmus na expresiu rekombinantných proteínov. Promotory, ktoré sa bežne používajú pri konštrukcii rekombinantnej DNA, zahŕňujú laktóзовé promotorové systémy (Chang et al. (1978) Nature 275: 615; Itakura et al. (1978) Science 198: 1056; Goedell et al. (1979) Nature 281: 544! a tryptofánové (*trp*) promotorové systémy (Goedell et al. (1980) Nuc. Acids Res. 8: 4057) a EP-A-0 036 776. Tieto promotory sa síce používajú najčastejšie, ale boli objavené aj iné mikrobiálne promotory, pričom boli tiež publikované podrobnosti vzťahujúce sa na ich nukleotidovú sekvenciu, čo umožňuje odborníkom v tomto obore ligovať ich funkčne do plazmidových vektorov (Sienbenlist et al. (1980) Cell 20: 269).

Okrem prokaryotov sa tiež môžu použiť eukaryotické mikróby, ako sú napríklad kvasinkové kultúry. najčastejšie používané

eukaryotické mikroorganizmy sú kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* alebo bežné kvasnice, napriek tomu, že je dostupné množstvo iných kmeňov. Na expresiu v *Saccharomyces* sa napríklad bežne používa plazmid YRp7 (Sinchcomb et al., (1979) *Nature* 282: 39; Kingsman et al., (1979) *Gene* 87: 141; Tschemper et al., (1980) *Gene* 19: 157). Tento plazmid už obsahuje gén *trp1*, ktorý poskytuje selekčný markér pre mutantný kmeň kvasinky, ktorá nemá schopnosť rásť na tryptofáne, ako je napríklad ATCC č. 44076 alebo PEP4-1 (Jones (1977), *Genetics* 8: 85:12). Prítomnosť lézie *trp1*, ako aj vlastnosť genómu kvasinkovej hostiteľskej bunky potom zaistuje efektívny prostriedok na detekciu transformácie rastu za neprítomnosti tryptofánu.

Vhodné promotujúce sekvencie v kvasinkových vektoroch zahŕňajú promotory pre 3-fosfoglycerátkinázu alebo iné glykolytické enzýmy, ako je enoláza, glyceraldehyd, 3-fosfát dehydrogenáza, hexokináza, pyruvát dekarboxyláza, fosfofrukto-kináza, glukóza-6-fosfátizomeráza, 3-fosforylcerátmutáza, pyruvátkináza, triozefosfátizomeráza, fosfoglukóza izomeráza a glukokináza (Hess et al. (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149; Holland et al. (1978) *Biochemistry* 17: 4900). Pri konštrukcii vhodných plazmidov sa terminačné sekvencie spojené s týmito génmi ligujú do expresného vektora v zmesi k 3' do sekvencie, ktorá má byť exprimovaná, čím sa zaistí polyadenylácia mRNA a terminácia. Iné promotory, ktoré vykazujú prídavnú výhodu transkripcie kontrolovanej rastovými podmienkami, sú promotorové oblasti pre alkoholdehydrogenázu 2, izocytochróm C, kyselínofosfatáza, degradečné enzýmy spojené s dusíkovým metabolizmom a vyššie uvedená glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, čo je enzým zodpovedný za utilizáciu maltózy a galaktózy. Vhodný je akýkoľvek plazmidový vektor obsahujúci promotor kompatibilný s kvasinkou, začiatok replikácie a terminačnú sekvenciu.

Okrem mikroorganizmov sa ako hostitelia môžu tiež použiť bunkové kultúry získané z viacbunkových organizmov. Všeobecne sa môže pracovať s akoukoľvek takouto bunkovou kultúrou, či už pochádza zo stavovcov alebo bezstavovcov. Až doteraz však bol

najväčší záujem zameraný na bunky stavovcov a propagácia buniek stavovcov v kultúrach sa stala v poslednom čase rutinným postupom (Kruse a Patterson (1973) *Tissue Culture*, Academic Press). Ako príklady takýchto užitočných hostiteľských bunkových línií je možné uviesť bunkové línie VERO, HeLa, bunky ovárií čínskeho chrčka (CHO), W138, BHK, COS-7, MDCK a bunkové línie myelómu a gsmyelómu (k dispozícii od firmy Celltech, Slough, Veľká Británia). Expresné vektory pre takéto bunky môžu poprípade zahrňovať vhodný začiatok replikácie, ako aj promotor umiestený pred génom, ktorý má byť exprimovaný, spolu s akýmikoľvek potrebnými ribozomálnymi väzbovými miestami, miestami RNA zostrihu, polyadenylačnými miestami a terminačnými sekvenciami transkripcie.

Pokiaľ ide o bunky cicavcov, zaisťuje kontrolné funkcie expresných vektorov často vírusový materiál. Tak napríklad bežne používané promotory sú odvodené z humánneho cytomegalovírusu (HCMV), polyómavírusu, adenovírusu 2 a najčastejšie z opičieho vírusu 40 (SV40). Osobitne užitočné sú skoré a neskoré promotory vírusu SV40, keďže obidva sa z vírusu ľahko získavajú v podobe fragmentu, ktorý tiež obsahuje vírusový začiatok replikácie z SV40 (Fiers et al. (1978) *Nature* 273: 113). Ďalej je tiež možné a často žiadúce, používať promotor alebo kontrolné sekvencie, ktoré sú normálne asociované s požadovanou génovou sekvenciou, za predpokladu, že takéto kontrolné sekvencie sú kompatibilné so systémom hostiteľských buniek.

Začiatok replikácie sa môže zaistiť buď tým, že sa skonštruuje vektor, ktorý obsahuje exogénny začiatok, ako napríklad začiatok odvodený z SV40 alebo iného vírusového zdroja (napríklad polyómavírusu, adenovírusu, VSV alebo BPV) alebo sa môže začiatok dodať prostredníctvom mechanizmu replikácie chromozómov hostiteľskej bunky. Ak je vektor integrovaný do chromozómu hostiteľskej bunky, posledné uvedené riešenie je často dostačujúce.

Vektory obsahujúce segmenty DNA, ktoré sú predmetom záujmu

(napríklad sekvencie kódujúce ťažký a ľahký reťazec a sekvencie na kontrolu expresie) je možné preniesť do hostiteľskej bunky pomocou dobre známych metód, ktoré sa líšia v závislosti od typu bunkového hostiteľa. Tak napríklad pokiaľ ide o prokaryotické bunky, obvykle sa používa transfekcia použitím chloridu vápenatého, zatiaľ čo pre iných bunkových hostiteľov je možné použiť spracovanie pomocou fosforečnanu vápenatého, lipofekcie alebo elektroporácie (Monaitis et al. (1990) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, II. vydanie, Cold Spring Harbor Press).

Po expresii je možné konštrukty podľa vynálezu purifikovať pomocou štandardných metód známych v tomto obore, ako je zrážanie síranom amónnym, čistenie na afinitných stĺpcoch, stĺpcová chromatografia a gélová elektroforéza (Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer Verlag. N. Y.). Väzbová afinita takto exprimovaných konštruktov sa môže zistiť pomocou techník známych v tomto obore, ktoré sú úplne objasnené v príkladovej časti tohto popisu.

Dáva sa prednosť v podstate čistým CDR-štepeným protilátkam alebo ich väzbovým proteínom s homogenitou aspoň 90 až 95 %. Pokiaľ ide o farmaceutické použitie, najväčšie prednosť sa dáva preparátom s homogenitou 98 až 99 %. Po purifikácii, čiastočnej alebo až do dosiahnutia požadovaného stupňa homogenity, sa CDR-štepené protilátky môžu použiť na diagnostické alebo terapeutické účely (vrátane extrakorporálneho použitia) alebo pri vývoji a uskutočňovaní skúšobných postupov pomocou imunofluorescenčného farbenia a pod. (Lefkovite a Pernis (1979 a 1981) *Immunological Methods*, zv. I a II, Academic Press N.Y.).

CDR-štepené protilátky alebo ich väzbové proteíny podľa tohto vynálezu budú nachádzať použitie pri liečení chorôb sprostredkovaných T-bunkami. Ako príklad typických chorobných stavov, ktoré je možné liečiť týmito látkami, je možné uviesť autoimunitné choroby, ako je diabetes typu I, roztrúsená skleróza, reumatoidná artritída, systemický lupus erythematosus, Crohnova choroba a myasthenia gravis.

Terapeutické použitie T-bunkových protilátok podľa vynálezu je založené na korelácii medzi špecifickou chorobou majúcou vzťah k imunite a preferenčnou expresiou určitého produktu génu oblasti V antigénu T-bunky alebo rozšíreného využitia určitého génu receptora V antigénu T-bunky. Oblasť receptora V antigénu T-bunky sú čiastočne užitočné, keďže je možné regulovať imunitnú odpoveď individua pomocou špecifickej terapeutickú intervencie použitím receptora antigénu T-buniek. Konkrétne sa ukázalo, že prítomnosť expresie určitého miesta variabilnej oblasti koreluje s určitými imunitne sprostredkovanými poruchami. Stanovením určitých miest oblasti V, ktoré sú spojené s určitou poruchou imunity, je možné dospieť k liečeniu individua pomocou inhibície napadnutia T-bunkami nesúcimi určitú oblasť V.

Pod označením "liečenie" sa podľa vynálezu rozumejú situácie inak označované termínmi "prevencia", "potláčanie" alebo vlastné "liečenie" choroby. Prevencia zahŕňa podávanie protektívneho prostriedku pred indukciou choroby. Tak napríklad pokiaľ ide o zvierací model "EAE", prejaví sa úspešné podanie protektívneho prostriedku pred vstriknutím encefalitogénu indukujúceho chorobu ako prevencia tejto choroby.

Potlačenie zahŕňa podanie prostriedku po indukcii, ale pred klinickým prejavom choroby. Použitím EAE, ako príkladu, úspešné podanie protektívneho prostriedku po injekcii encefalitogénu, ale pred vznikom neuralogických symptómov, zahŕňa potlačenie tejto choroby.

Liečenie zahŕňa podanie protektívneho prostriedku po manifestácii choroby. Použitím príkladu s EAE, úspešné podanie protektívneho prostriedku po injekcii encefalitogénu a po výskyte klinických príznakov predstavuje liečenie choroby.

Pri zisťovaní účinnosti protilátok alebo ich väzbových proteínov pri ochrane proti chorobám alebo pri ich liečení sú k dispozícii zvieracie modelové systémy. Systemický lupus

erythromatosus (SLE) sa skúša na susceptibilných myšiach pomocou spôsobu popísaného v Knight et al., (1978) J. Exp. Med. 147: 1653 a Reinersten et al., (1978) New Eng. J. Med. 299: 515. Myasthenia gravis (MG) sa skúša na samiciach myši SJL/J pomocou indukcie choroby rozpustným AChR proteínom od iného druhu spôsobom popísaným v Lindstrom et al. (1988) Adv. Immunol. 42:233-284. Artritída sa indukuje susceptibilnému kmeňu myši pomocou injekcie kolagénu typu II spôsobom popísaným v Stuart et al., (1984) Ann. Rev. Immunol. 42:233-284. Adjuvantná artritída sa indukuje susceptibilným potkanom pomocou injekcie mykobakteriálneho proteínu tepelným šokom spôsobom popísaným vo Van Eden et al., (1988) Nature 331:171-173. Tyreoditída sa myšiam indukuje podaním tyreoglobulínu, ako je to popísané v Maron et al., (1980) J. Exp. Med. 152:1115-1120. Pokiaľ ide o inzulíndependentnú diabetes mellitus (IDDM), používajú sa spontánne sa vyskytnuvšie sa prípady alebo sa táto choroba indukuje určitým kmeňom myší, ktoré sú napríklad popísané v Kanasawa et al., (1984) Diabetologia 27:113. EAE myší a potkanov slúžia ako model pre roztrúsenú sklerózu človeka. Pokiaľ ide o tento model, demyelinačná choroba sa indukuje podaním proteínu na báze myelínu spôsobom popísaným v Paterson (1986) Textbook of Immunopathology (Mischer et al., Eds.) Grune a Stratton, New York, str. 179-213; McFarlin et al. (1973) Science 179: 478-480 a Satoh et al. (1987) J. Immunol. 138:179-184.

CDR-štepené protilátky alebo ich väzbové proteíny podľa vynálezu sa tiež môžu používať v kombinácii s inými protilátkami, predovšetkým protilátkami mAb, ktoré sú reaktívne s inými markérmí na humánných bunkách, ktoré sú zodpovedné za tieto choroby. Tak napríklad vhodné T-bunkové markéry môžu zahrňovať markéry zoskupené do tzv. diferenciačných zhľukov ("Clusters of Differentiation"), ako boli nazvané na First International Leukocyte Differentiation Workshop (Bernhard et al., (1984) Leukocyte Typing, Springer Verlag, NY). CDR-štepené protilátky alebo ich väzbové proteíny sa budú obvykle používať v purifikovanej forme spolu s farmakologicky vhodnými nosičmi. Ako obvyklé nosiče je možné uviesť vodné a vodno-alkoholické roztoky,

emulzie alebo suspenzie, vrátane soľných a pufrovaných médií. Parenterálne nosiče zahŕňujú roztok chloridu sodného, Ringerov roztok dextrózy a zmesi dextrózy a chloridu sodného, ako aj laktátové Ringerove roztoky. Prípadné fyziologicky vhodné pomocné látky na udržanie komplexu v suspenzii je možné uvoľniť zo súboru zahusťovadiel, ako je napríklad karboxymetylcelulóza, polyvinylpyrolidón, želatína a algináty.

Intravenózne vehikulá zahŕňujú doplnky tekutiny, živín a elektrolytov a ide napríklad o vehikulá na báze Ringerovho roztoku dextrózy. Prítomné môžu byť aj také činidlá, ako je napríklad konzervačná látka a iné prísady, napríklad antimikrobiálne látky, antioxidanty, chelatačné činidlá a inertné plyny (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. vydanie).

Konštrukty podľa vynálezu sa môžu používať vo forme separátne podávaných prostriedkov alebo vo forme kombinácií s inými činidlami. Tieto kombinácie môžu zahŕňať rôzne imunoterapeutické liečivá, ako je napríklad cyklosporín, metotrexát, adriamycín a cisplatinum a ďalej tiež imunotoxíny. Farmaceutické prostriedky môžu zahŕňať "koktejly" rôznych cytotoxických alebo iných činidiel v spojení s CDR-štepenými protilátkami alebo ich väzbovými proteínmi podľa tohto vynálezu. Môže tiež ísť aj o dokonca kombinácie konštruktov podľa vynálezu a CDR-štepených protilátok s rôznymi špecificitami.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu sa môžu podávať rôznymi spôsobmi, ktoré sú vo všeobecne známe odborníkom v tomto obore. Pri liečení, ako jeho neobmedzujúci príklad je možné uviesť imunoterapiu, sa CDR-štepené protilátky alebo ich väzbové proteíny podľa vynálezu môžu podávať akýmkoľvek pacientom v súlade so štandardnými technikami. Podávanie sa môže uskutočňovať pomocou akejkoľvek vhodnej cesty a môže teda ísť o podávanie parenterálne, intravenózne, intramuskulárne, intraperitoneálne alebo tiež o podávanie pomocou priamej infúzie katétrom. Posledný spôsob podávania je osobitne vhodný. Dávkovanie a frekvencia podávania budú závisieť od veku, pohlavia a stavu pacienta,

súbežného podávania iných liečiv, kontraindikačných a iných parametrov, ktoré budú musieť zobrať do úvahy lekári.

Konštrukty podľa vynálezu je možné lyofilizovať kvôli uľahčeniu skladovania a pred použitím rekonštituovať pomocou vhodného nosiča. Táto technika sa ukázala ako účinná pokiaľ ide o konvenčné imunoglobulíny a môžu sa pri nej použiť známe lyofilizačné a rekonštitučné postupy. Odborníkom v tomto obore je zrejmé, že lyofilizácia a rekonštitúcia môže viesť k rôznemu stupňu deaktivácie protilátok (pokiaľ ide o konvenčné imunoglobulíny, majú napríklad IgM protilátky sklon k vyššiemu poklesu aktivity ako IgG protilátky) a že môže byť nutné kompenzovať tieto straty prispôbením dávkovania.

Prostriedky obsahujúce CDR-štepene protilátky alebo ich koktejl je možné podávať pri profylaktickom a/alebo kuratívnom liečení. Pri určitých terapeutických aplikáciách sa ako "terapeuticky účinná dávka" označuje množstvo, ktoré je vhodné, a by sa dosiahla aspoň čiastočná inhibícia, potlačenie, modulácia, usmrtenie alebo iný merateľný parameter populácie zvolených buniek. Množstvá potrebná na dosiahnutie tejto dávky budú závisieť od závažnosti choroby a celkového stavu vlastného imunitného systému pacienta, ale obvykle budú ležať v rozmedzí od 0,005 do 5,0 mg CDR-štepenej protilátky alebo jej väzbového proteínu, počítané na kg telesnej hmotnosti. Obvykle sa budú používať dávky v rozmedzí od 0,05 do 2,0 mg/kg/dávka. Pri profylaktických aplikáciách sa môžu prostriedky obsahujúce konštrukty podľa vynálezu alebo ich koktejly podávať v podobných alebo mierne znížených dávkach.

Prostriedky obsahujúce konštrukt podľa vynálezu sa môžu používať profylakticky alebo terapeuticky, aby sa umožnila alterácia, inaktivácia, usmrtenie alebo odstránenie zvolenej cieľovej populácie T-buniek cicavca.

Pri inej realizácii tohto vynálezu sa konštrukty popísané vyššie môžu používať mimo tela alebo in vitro, aby nastalo

selektívne usmrtenie, vyčerpanie alebo iné efektívne odstránenie cieľovej populácie buniek z heterogénnej zbierky buniek. Krv cicavca sa môže mimo tela uviesť do styku s CDR-štepými protilátkami alebo ich väzbovými proteínmi, pričom dôjde k usmrteniu alebo inému odstráneniu nežiadúcich buniek z krvi a potom sa takto spracovaná krv môže pomocou štandardných techník vrátiť cicavcovi.

Okrem terapeutických použití sa konštrukty podľa vynálezu môžu použiť aj v iných súvislostiach. Podľa jednej realizácie tohto vynálezu sa protilátky podľa vynálezu alebo ich väzbové proteíny môžu použiť pri výskume. Proteíny viažúce receptor T-buniek alebo protilátky podľa vynálezu sú tiež užitočné pri štruktúrnych a funkčných štúdiách týkajúcich sa receptora T-buniek. Okrem toho, že slúžia ako substráty alebo väzbové domény pre špecifické formy receptorov T-buniek, môžu tieto protilátkové konštrukty slúžiť ako prostriedok pre výskum konformačných štúdií s cieľom aproximácie natívnych konfigurácií rôznych častí receptora T-bunky. Pri ešte ďalšej realizácii tohto vynálezu sa T-bunkové protilátky alebo ich väzbové proteíny môžu použiť ako diagnostické próby. Pri jednej špecifickej realizácii tohto vynálezu sa môžu konštrukty podľa vynálezu použiť pri stanovení množstva alebo prítomnosti určitej podčelade oblasti V T-buniek v biologickej vzorke. Jedno takéto stanovenie je popísané v Ritterhaus-WO 92/08981 (prihláška publikovaná 26. mája 1992 pod názvom "Therapeutic and Diagnostic Methods Using Total Leucocyte Surface Antigens"). Predmetom vynálezu sú teda tiež spôsoby diagnostikácie chorôb majúcich vzťah k imunite, ako je roztrúsená skleróza, ktorých podstatou je detekcie špecifického podsúboru receptora antigénu T-bunky v biologickej vzorke.

CDR-štepené protilátky alebo ich väzbové proteíny je možné značiť pomocou technológií, ktoré sú známe v tomto obore. Konštrukty sú tiež sa hodia na iné in vivo ciele. Tak napríklad sa môžu použiť na selektívne ošetrovanie periférnej krvi, kde je žiadúce eliminovať len cieľové T-lymfocyty alebo na iné podobné ciele, ak je potrebné v bunkových kultúrach eliminovať nežiadúce

T-lymfocyty.

Vynález je bližšie objasnený v nasledujúcich príkladoch realizácie. Tieto príklady majú výlučne ilustratívny charakter a rozsah vynálezu v žiadnom ohľade neobmedzujú.

Príklady realizácie vynálezu

P r í k l a d 1

TM27 - prehľad operácií

1. Myši BALB/c boli imunizované leukemickou bunkovou líniou T-buniek HPB-A11 (raz intraperitoneálne a dvakrát intravenózne).
2. Bunky sleziny z týchto myši boli zhromaždené a fuzionované s myšacou myelómovou imortalizačnou bunkovou líniou P3X53AG8.653.
3. Bola uskutočnená selekcia vhodných klonov v médiu HAT.
4. Bol uskutočnený screening takto vybraných klonov na príslušnú väzbu pomocou imunoprecipitácie rádioizotopom značenej bunkovej línie HPB-A11.
5. Boli uskutočnené subklonovanie použitím techniky limitného riedenia.
6. Pomocou PBL stimulačných a CD3 modulačných štúdií bola uskutočnená skúška špecificity.
7. Hybridóm vylučujúci príslušnú protilátku bol označený skratkou 4H11.
8. Z tohto klonu bola získaná RNA a potom izolovaná mRNA. Bola pripravená cDNA pre túto mRNA.

9. cDNA bola sekvenovaná a bola uskutočnená skúška presnosti.

10. Izolované cDNA (H a K) boli klonované do vektorov M13.

11. Pomocou mutagenézy, ktorej príklad je uvedený v príklade 2, boli zavedené zvolené oblasti humánnej základnej štruktúry.

12. Humanizované protilátky (vždy asi 1 mg) boli purifikované z NSO transfektantov s cieľom predbežného hodnotenia.

Bolo vytvorených 5 rôznych TM27:

TM27L: s leucínom v polohe 48 ťažkého reťazca

TM27I: s izoleucínom v polohe 48 ťažkého reťazca

TM27.1: s FS až VF (78-79) zmenami

TM27.2: s VTML/T až LSIS/N (67-70/73) zmenami

TM27.3: s V až R (92) zmenami.

Podrobný popis experimentu

Zhrnutie

Cieľom tohto projektu bolo humanizovanie myšacej antihumánnej TCR (receptor T-bunky) Vbeta 5.2/5.3 monoklonálnej protilátky (TM23) a vytvorenie bunkovej línie exprimujúcej humanizovanú protilátku, ktorá by bola vhodná pre ďalší výskum. Táto humanizovaná anti-TCR Vbeta 5.2/5.3 monoklonálna protilátka je TM27.

Myšacia protilátka

Hybridóm 4H11 bol vyvinutý pomocou fúzie myšacej myelómovej bunkovej línie P3X63AG8.653 so slezinnými bunkami myši BALB/c imunizovaných leukemickou bunkovou líniou T-buniek HPB-ALL. Tento hybridóm exprimuje monoklonálnu protilátku TM23 so špecificitou

voči Vbeta 5.2 a 5.3 humánneho receptora T-buniek (TCR). Tento izotyp bol označený skratkou IgG2a/kapa.

Humanizácia

cDNA kódujúca ťažký a ľahký reťazec TM23 sa izoluje z knižnice cDNA 4H11 skonštruovanej použitím myšacieho IgG2a a kapa špecifických 3' koncových primérov. Izolované cDNA klony boli potvrdené sekvenovaním DNA a vnútorným sekvenovaním aminokyselín. Oblasti CDR (oblasti určujúce komplementaritu) ťažkého a ľahkého reťazca boli identifikované na základe zákrytu konzervovaných sekvencií myši základnej štruktúry. DNA fragmenty L, V, (D), J (L = vedúci, V = variabilný, D = diverzný a J = spájajúci) boli izolované pomocou PCR a klonované do CHO bunkových expresných vektorov pTCSLCKapaDHFR a pTCSLCg1NeoAp nesúcich humánne cDNA kapa a IgG1 konštantné oblasti, s cieľom expresie myšacej V/humánnej C chimerickej protilátky.

Na základe porovnania sekvencií aminokyselín dedukovaných z týchto klonov cDNA bolo zistené, že ťažký reťazec TM23 patrí do Kabatovej podskupiny IB. Ďalej sa zistilo, že sekvencia Vkapa patrí do Kabatovej podskupiny Vkapa V. Preto boli na humanizáciu ťažkého a ľahkého reťazca vybrané humánne základné štruktúry NEWM (ťažký reťazec) a REI (ľahký reťazec). Prešmyknuté fragmenty V(D)J (s výnimkou časti 5' V a 3' J) boli klonované do vektorov M13 nesúcich vedúcu a intronovú sekvenciu v genómovej konfigurácii, s cieľom vytvorenia úplných genómových konštruktov L-V(D)J.

Expresia myelómu

Po konštrukcii CDR-štepových oblastí V(D)J mutagenézou boli fragmenty DNA klonované do myelómových expresných vektorov nesúcich konštantnú oblasť buď humánneho kapa, alebo IgG1. Bolo skonštruovaných päť ťažkých reťazcov s rôznymi mutáciami. Každý z týchto piatich konštruktov ťažkého reťazca bol kotransfekovaný s humanizovaným ľahkým reťazcom do bunkovej línie myelómu NSO.

Humanizované protilátky boli purifikované zo supernatantov kultúr expandovaných humánnych IgG1/kapa pozitívnych transfektantov s cieľom vyhodnotenia. Výsledky ukázali, že TM27L s najmenej myšacími aminokyselinovými sekvenciami farbí Vbeta 5.3 T-bunky rovnako tak, ako aj ostatné humanizované verzie, ako nie lepšie. Preto boli TM27L zvolené pre ďalší vývoj a boli označené ako TM27.

Expresia v bunkách CHO

Vedúca oblasť a oblasť V ťažkého a ľahkého reťazca TM27 boli izolované z myelómových konštruktov pomocou PCR s cieľom klonovania v cDNA konfigurácii do expresných systémov s bunkami CHO, pTCSLCg1NeoAp (ťažký) a pTCSLCkapaDHFR (ľahký), ako to bolo popísané vyššie. Boli selektované transfektanty buniek CHO a humánne IgG1/kapa pozitívne bunky boli klonované. Jeden z najväčších producentov, TM27L-662-35 bol expandovaný pre "cell banking" a prípravu humanizovanej Ab v malom rozmere. Protilátka TM27 exprimovaná v CHO bola charakterizovaná počas postupu tohto projektu a zistilo sa, že je porovnateľná s protilátkou z myelómovej bunkovej línie a rodičovskou TM23. Súbežne boli klony buniek CHO podrobené amplifikácii a klonované s cieľom zvýšenia expresie protilátky a demonštrácie vhodnosti tohto kmeňa na zlepšenie produktivity.

Podrobný popis

Imunizácia myší BALB/c pomocou HPB-ALL

beta F1 (antihumánna monoklonálna protilátka na báze konštantnej oblasti receptora beta reťazca receptora T-bunky) a imuniprecipitát leukemických humánnych T-buniek HPB-ALL (3×10^7) od dr. Michaela Brennera (Harvard Medical School) boli zmiešané s úplným Freundovým adjuvans a pomocou intraperitoneálnej injekcie podané myšiam BALB/c. Po piatich týždňoch sa provokácia zintenzívnila podaním posilňovacej dávky 3×10^7 týchto buniek v soľnom roztoku počas troch po sebe idúcich dní, pričom prvé

podanie bolo intraperitoneálne a nasledujúce dve podania boli intravenózne.

Fúzie slezinných buniek s P3X63AG8.653

Fúzia bola uskutočnená pomocou zavedených techník tri dni po záverečnej intravenóznej posilňovacej dávke. Slezinné bunky v päťnásobnom nadbytku boli fuzionované s bunkami P3X63AG8.653 (bunky myšacieho myelómu, línia nevylučujúca Ig, s pôvodom z myši BALB/c, ATCC, CRL 1580) použitím 50% polyetylénglykolu 1 500 (BDH, Dorset, Veľká Británia).

Selekcia fuzionovaných buniek pomocou HAT

Fuzionované bunky boli nanosené do 96-jamkových misiek pri 2×10^5 BALB/c tymocytov na jamku, ako zdroj živín. Selekcia sa uskutočňuje v médiu RPMI-1640 s obsahom 15 % FBS (fetálne teľacie sérum) a HAT (6mM hypoxantín, 50mM aminopterín a 2mM tymidín). Bunky boli inkubované vo vlhkom vzduchu s obsahom 5 % oxidu uhličitého pri 37 °C.

Screening hybridómov

Po 13 až 14 dňoch bol uskutočnený screening jamiek, jednak použitím skúšky ELISA a jednak použitím imuniprecipitácie buniek HPB-ALL označených rádioizotopom ^{125}I . Pri podmienkach imunoprecipitácie dochádza k disociácii molekúl CD3 od alfa a beta reťazca TCR. Hybridómy, ktoré zreagovali s HPB-ALL boli expandované do nádob T-75 na ďalšie klonovanie.

Klonovanie hybridómov, ktoré sú predmetom záujmu

Hybridómy so špecificitou pre HPB-ALL TCR (receptor antigénu T-bunky) boli klonované použitím techniky limitného riedenia. Bunky boli nanosené na 96-jamkové kultivačné misky s dvojnásobným sériovým riedením hustoty buniek v rozmedzí od 2 do 0,015 bunky/jamku. Najlepšie rastúca kolónia s najvyššou

produktivitou bola vybraná na opakovanie vyššie uvedeného postupu (dvakrát). Po týchto dvoch prídavných kolách selekcie bola identifikovaná jedna z výsledných kolónií a tá bola označená skratkou 4H11. mAb exprimovaná klonom 4H11 vyzrážala pri imunoprecipitácii molekuly identické s alfa a beta reťazcom TCR vyzrážaním s beta F1 mAb, ktorá reaguje s konštantnou oblasťou beta reťazca TCR. Tento výsledok ukazuje, že táto mAb vykazovala špecificitu voči beta reťazcu TCR exprimovanému na T-bunkách HPB-ALL. Získaná protilátka bola označená pomocou dohovoreného označenia TM23.

Charakterizácia monoklonálnej protilátky TM23 z hybridómu 4H11

Izotopovanie TM23 bolo uskutočnené použitím obchodne dostupnej súpravy (Zymed, South San Francisco, Kalifornia, USA). Výsledky ukázali, že ide o izotyp myšacej IgG2a/kapa.

Na potvrdenie anti-PCR reaktivity TM23 mAb bol uskutočnený screening získanej protilátky na schopnosť komodulovať molekulu CD3 z povrchu buniek HPB-ALL. Predtým štúdie ukázali, že protilátky mAb k alfa alebo B reťazcu TCR sú schopné komodulovať CD3 z povrchu buniek, ak sú bunky preinkubované s anti-TCR mAb. Ak boli bunky HPB-ALL predbežne inkubované TM23 bol pozorovaný významný pokles ich reaktivity s anti-CD3 mAb Leu-4 v porovnaní s Leu-4 reaktivitou pozorovanou u neošetrených buniek.

Normálne humánne PBL (periférne krvné lymfocyty) boli skúšané na reaktivitu s TM23. S TM23 reagovalo 1,6 až 3,0 % študovaných T-buniek PBL. Tento výsledok je typický pre výsledky získané z niekoľkými inými mAb, u ktorých sa ukázalo, že reagujú so špecifickými determinantmi oblasti V.

Aby sa stanovilo, či sa TM23 viaže k rovnakému epitopu ako 1C1, mAb, ktorá reaguje s humánnou Vbeta 5.2 a 5.3 podtriedou (Boylston et al., 1986, J. Immunol. 137: 741), bola študovaná schopnosť jednej mAb blokovat väzbu inej mAb. Ak boli bunky HPB-ALL najprv inkubované TM23, väzba 1C1 konjugovaného s

fluorescínom bola inhibovaná. Tiež, ak boli bunky inkubované najprv 1C1 bola väzba k TM23 inhibovaná. Tieto výsledky ukazujú, že sa ZM23 a 1C1 viažu k rovnakým alebo blízkym susedným epitopom.

Aby sa ďalej zistilo, či v TM23 a 1C1 vykazujú podobnú reaktivitu, boli pripravené línie PBL pomocou stimulácie inými mAb. Každá línia bola potom skúšaná na reaktivitu s každou mAb. Ak bola PBL línia získaná pomocou stimulácie TM23, ako 1C1, tak aj 4H11 zreagovali s podobným percentným podielom buniek. To isté platí o PBL línii stimulovanej 1C1.

Pestovanie kultúry buniek 4H11

Klon 4H11, TM23.1 7-31-91 bol pestovaný a expandovaný do média DMEM/F12 (1+1 s 1 % fetálneho teľacieho séra, 100 mikro/ml penicilínu, 100 mikro/ml streptomycínu a 12,5mM glutamínu).

Príprava cDNA kódujúcej ťažký a ľahký reťazec TM23

Asi 10^8 buniek 4H11 bolo izolovaných pomocou centrifugácie a raz premytých ľadovo chladným PBS. Celá RNA bola pripravená použitím súpravy Promega RNAAgents Total RNA Isolation Kit (Promega, katalógové číslo Z5110). Poly (A)⁺ RNA bola pripravená použitím súpravy Promega PolyAtract mRNA Isolation System (Promega, katalógové číslo Z5200). Myšacia IgG2a a kapa-špecifická cDNA knižnica bola pripravená použitím súpravy BRL SuperScript Kit (BRL, katalógové číslo 82Y8SA) s IgG2a primérom

5' ATATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTTAGT 3'

a kapa primérom

5' ATATGCGGCCGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAAT 3'

Tieto dva priméry obsahujú miesta pre reštrikčný enzým XhoI a sekvencie komplementárne k 3' koncu myšacej oblasti IgG2a a

kapa-kódujúcej oblasti. cDNA bola klonovaná do plazmidu pSPORT dodaného v súprave a transformovaná do E. coli DH5a kompetentných buniek pomocou elektroporácie. Klony plazmidu nesúce inserty so správnou veľkosťou boli selektované pre sekvenovanie.

Identifikácia cDNA klonov kódujúcich ťažký a ľahký reťazec TM23

"Mini-prep" plazmidová DNA s insertmi so správnou veľkosťou (klony ľahkého reťazca č. 1, 6, 19, 20, 25 a 26 a klony ťažkého reťazca č. 4, 9, 11, 15, 22 a 34) boli podrobené sekvenovaniu dvojreťazcovej DNA použitím sekvenačnej súpravy Sequencing Kit (USB, katalógové číslo 70770) s T7 primérom 5' vzhľadom na DNA inserty. Sekvencie klonov ľahkého reťazca číslo 6, 20 a 25 a klonov ťažkého reťazca č. 34 ukázali, že ide o myšacie Ig klony. Klony ľahkého reťazca č. 6, 20 a 25 mali identické sekvencie a klon č. 6 obsahoval bodovú mutáciu; išlo o nefunkčný klon. Klony č. 20 a 34 boli sekvenované použitím primérov špecifických voči konštantnej oblasti kapa.

5' GACATTGATGTCTTTGGGGTAGAAGTTGTT 3'

a. IgG2a

5' GGTCACCTGGCTCAGGGAAATAACCCCTTGAC 3'

Výsledky opäť ukázali, že klon č. 6 bol nefunkčný a klony č. 20 a 34 boli správne klony pre ľahký a ťažký reťazec. cDNA a aminokyselinová sekvencia dedukovaná z týchto dvoch klonov je uvedená na obr. 1.

V dôsledku N-terminálneho blokovania bolo mikrosekvenovanie aminokyselín uskutočnené na brómkyanom vyštepovaných peptidových fragmentoch izolovaných z polyakrylamidových gélov. Aminokyselinové sekvencie vnútornej oblasti V získané pri tomto postupe boli konzistentné so sekvenciami dedukovanými z cDNA sekvencií. Tieto výsledky potvrdili, že izolované cDNA klony boli klony kódujúce ťažký a ľahký reťazec TM23.

Pomocou metódy, ktorú popísali Kabat a Wu (pozri vyššie uvedená citácia) boli identifikované oblasti CDR ťažkého a ľahkého reťazca (tieto oblasti sú na obr. 1 zdôraznené a podtrhnuté).

PCR izolácia DNA oblasti V ťažkého a ľahkého reťazca a sekvenovanie DNA

Produkcia chimerickej protilátky TM23

Izolácia myšacej VH DNA a NK DNA

Variabilné oblasti ťažkého a ľahkého reťazca TM23 boli upravené pre inserciu do expresných vektorov. Sekvencia DNA kódujúca myšaciu VH TM23 bola amplifikovaná z TM23MuVH.MuIgG2a pomocou PCR použitím oligonukleotidového priméru VH1BACK

(5' AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3')

obsahujúceho miesto pre restričný enzým Pst I a priméru VH1FOR

5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG 3'

ktorý podobne obsahuje miesto BstEII. M predstavuje C alebo A, S predstavuje C alebo G, R predstavuje A alebo G a W predstavuje A alebo T. Tieto miesta tým boli zavedené k 5' a 3' koncu TM23VH DNA. Amplifikovaná DNA bola rozštiepená PstI a BstEII a ligovaná do PstI a BstEII miest dvojreťazcovej replikantnej formy (RF) DNA vektora M13 VHPCR1, rozštiepeného pomocou rovnakých enzýmov.

Vektor M13 VHPCR1 je M13 fágový vektor odvodený z M13-HuVHNP (Jones et al. (1986) Nature 321: 522 až 525) a obsahuje imunoglobulinový promotor, signálnu sekvenciu a vhodné miesta zostrihu (Orlandi et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 3833 až 3837). Ligovaná DNA bola transformovaná do kompetentného kmeňa E. coli TG1 (K12, delta(lac-pro), supE, thi, hsd D5 [F' tra D36, pro^{A+B+}, lacO^q, lacZ M15]). Zo získaných rekombinantných fágových plakov bola pripravená jednoreťazcová DNA.

Sekvencia DNA kódujúca myšaciu VK TM23 bola amplifikovaná z TM23MuVK.MuCK pomocou PCR použitím oligonukleotidového priméru

VK1BACK

5' GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCA 3'

ktorý obsahuje miesto PvuII a priméru VK1FOR

5' GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC 3'

ktorý obsahuje miesto BglII v spojení s dvomi prekrývajpcimi sa vnútornými primérami zostrojenými s cieľom odstránenia miesta HindIII v CDR3, oligo 943

5' CCGAGGAAGTTTAGTATACTG 3'

a oligo 944

5' CAGTATAGTAAACTTCTTCGG 3'

(Horton et al., 1990). Tak boli miesta PvuII a BglII zavedené k 5' a 3' koncu TM23 VK DNA. Amplifikovaná DNA bola rozštiepená pomocou PvuII a BglII a ligovaná do M13 VKPCR1 rozštiepeného PvuII a BclI. Enzýmy BglII a BclI rozštiepili DNA za vzniku kompatibilných lepivých koncov, ktoré sa dajú spolu ligovať.

M13VKPCR1 obsahuje rovnaký promotor, signálnu sekvenciu a miesta zostrihu ako M13 VHPCR1 (Orlandi et al. (1989)).

Ligovaná DNA bola transformovaná do E. coli TG1 a zo získaných rekombinantných fágových plakov bola získaná jednoreťazcová DNA.

Boli získané PCR produkty so správnu veľkosťou (359 bp pre VH a 288 bp pre VK). VH DNA bola vložená do vektora M13VHPCR1 za vzniku M13 TM23MuVH. VK DNA bola vložená do vektora M13VKPCR1 za vzniku M13 TM23MuVK.

Potvrdenie sekvencií DNA

Bolo potvrdené, že boli klonované správne sekvencie DNA a že pomocou PCR neboli zavedené žiadne nesprávne mutácie. Pomocou dideoxymetódy (Sanger et al., 1977) použitím T7 DNA polymerázy alebo Sequenase bola získaná sekvencia jednoreťazcovej M13 fágovej DNA úplnej 823bp VH oblasti vrátane promotora, signálnej sekvencie, miesta zostrihu a 5' a 3' nepreloženej sekvencie.

Pomocou dideoxymetódy popísanej vyššie bola získaná sekvencia jednoreťazcovej M13 fágovej DNA úplnej 630bp VK oblasti vrátane signálnej sekvencie, miest zostrihu a 5' a 3' nepreložnej sekvencie.

Boli identifikované klony DNA s požadovanou sekvenciou pre TM23 VH prispôsobenú pre inserciu do expresného vektora. Jeden z týchto klonov, č. 2, bol zvolený pre ďalšiu prácu. Zavedenie požadovaných reštrikčných miest, ktoré boli potrebné na vloženie VH do expresného vektora, si vyžiadalo zmenu aminokyseliny pri N-konci; lyzínu (K) v polohe 5 na glutamín (G) a jednu zmenu pri C-konci, t.j. zmenu serínu (S) v polohe 108 na treonín (T).

Boli identifikované klony DNA s požadovanou sekvenciou pre TM23 VK prispôsobenou pre inserciu do expresného vektora. Jeden z týchto klonov, č. 4, bol zvolený pre ďalšiu prácu. Aminokyselinová sekvencia CDR3 nebola zmenená odstránením miesta HindIII, ale zavedenie požadovaných reštrikčných miest potrebných pre inserciu VK do expresného vektora malo za následok tri aminokyselinové zmeny pri N-konci: metionínu (M) v polohe 4 na leucín (L), treonínu (T) v polohe 7 na serín (S) a treonínu (T) v polohe 8 na prolín (P), ako aj jednu zmenu pri C-konci, t.j. valínu (V) v polohe 105 na glutamín (E), v dôsledku použitých primérov.

Klonovanie fragmentov DNA oblasti V do vektora M13

Bol uskutočnený prenos klonovanej myšacej variabilnej oblasti do expresných vektorov obsahujúcich gény s humánnou konštantnou oblasťou pre nasledujúcu expresiu protilátky v cicavčích bunkách.

Selekcia IgG izotypu pre humanizáciu

Humánný IgG1 izotyp bol zvolený pre TM27 z týchto dôvodov:

1) IgG1 má schopnosť sprostredkovať ako ADCC (cytotoxicitu voči

bunkám závislú od protilátky), tak aj CDC (cytotoxicitu závislú od komplementu). Preto môže mať väčšiu účinnosť pri regulácii T-buniek Vbeta 5.2/5.3 smerom dole a

2) IgG1 bolo pri AB humanizácii používané častejšie.

Selekcia humánnej základnej štruktúry pre CDR štep

Produkcia humanizovanej protilátky TM23

Zostrojovanie sekvencií variabilnej oblasti humanizovanej TM23

Bola uskutočnená selekcia sekvencií humánnej základnej štruktúry, aby sa získali oblasti CDR TM23 a stanovili esenciálne myšacie zvyšky, ktoré musia byť pomocou zámery zvedené do humánnej základnej oblasti. Pomocou počítača boli uskutočnené porovnania aminokyselinových sekvencií VH a VK TM23 a to ako so známymi sekvenciami iných myšacích protilátok, tak aj s VH a VK sekvenciou humánnej protilátky.

Bol použitý program ALLIGN od firmy DNASTAR Ltd., Londýn, W139BL Veľká Británia. Ako počítač bol použitý procesor Compaq 386. Program ALLIGN skúma priradenie dvoch proteínových sekvencií použitím Lipman-Pearsonovej metódy a Needleman-Wunschovej metódy. Najprv boli pomocou Lipman-Pearsonovej metódy stanovené najlepšie oblasti homológie. Potom bolo pomocou Needleman-Wuchsovej metódy zistené finálne priradenie sekvencií.

Zistené priradenie bolo potom vyskúšané, pričom osobitná pozornosť bola venovaná takým faktorom, ako je dĺžka oblastí CDR a zvyšky považované za kritické pre podoprenie konformácie týchto oblastí CDR, ako sú napríklad polohy 71 a 94 a zvyšky v blízkosti oblastí CDR (Tramontano et al. (1990; Foote a Winter (1992)).

Na základe porovnaní s konsenzuálnymi sekvenciami pre Kabatove podskupiny bola myšacia VHTM23 pridelená do Kabatovej podskupiny VK V. V základných štruktúrach TM23 nie sú prítomné žiadne aminokyselinové sekvencie, ktoré by boli pre tieto

podskupiny neobvyklé.

Humánne protilátky NEWM a REI poskytli sekvencie základnej štruktúry pre VH a VK. V prípade VH boli okrem oblasti CDR použité zvyšky 27 a 30 (vrátane) a 71. Tieto zvyšky základnej štruktúry sú považované za dôležité pre podoprenie konformácie oblastí CDR (Foote a Winter (1992)). Zvyšok 71 môže fixovať relatívne dispozície CDR1 a CDR2 podľa toho, či je prítomný objemný bočný reťazec (lyzín alebo arginín) alebo menší bočný reťazec (valín alebo alanín) (Tramontano et al. 1990). V NEWM VH bol teda valínový zvyšok v polohe 71 nahradený lyzínovým zvyškom, tak ako v TM23 VH. Zvyšky 27 až 30 tvoria časť štruktúrnej, skôr ako hypervariabilnej, slučky viažúcej antigén, ako ju definovali Chothia a Lesk (1987). Zvyšky základnej štruktúry 47 až 49 môžu byť tiež dôležité pre štruktúru protilátky (Foote a Winter (1992)). Preto boli skonštruované dva alternatívne humanizované ťažké reťazce: jeden s izoleucínom (I) v polohe 48, tak ako v NEWM a jeden s leucínom v polohe 48, aby mohli byť zachované zvyšky 47 až 49 z myšacej VH. Porovnanie myšacej VH sekvencie s humanizovanou verziou je ukázané v príklade 2.

Neboli uskutočnené žiadne zmeny v humánnej základnej štruktúre REI zvolenej pre TM23VK. Tiež porovnanie myšacej VK sekvencie s humanizovanou verziou je ukázané v príklade 2.

Popis cicavčieho expresného vektora pTCSNeo

Plazmid pTCSNeo obsahuje jedinečné klonovacie miesto XhoI, do ktorého sa vkladajú gény, ktoré sú predmetom záujmu. Transkripcia vloženého génu je poháňaná regulačnými sekvenciami, ktoré sú zložené z enhancéra SV40 umiestneného pred hlavným neskorým promotorom adenovírusu 2 (Ad2 MLP). Ad2 MLP je umiestnený pred tripartitnou vedúcou sekvenciou adenovírusu. Vložený gén je lemovaný polyadenylačným signálom myšacieho imunoglobulínu kapa (Ig_{κ}) pri 3' konci. Cicavčia selektovateľnosť bola udaná génom rezistencie voči neomycínu (Neo^r). Tento plazmid tiež obsahuje bakteriálny začiatok replikácie a beta-laktamázový gén (Amp^r).

Konštrukcia expresného vektora pTCSLNeo

Dva komplementárne oligonukleotidy so sekvenciami:
pozitívnu

5' CGACATCGATGATATCGAATTCGCGGCCCGCCAGCTGGGGCCCTCTAGAC 3'

a negatívnu

5' CGAGTCTAGAGGGCCCCAGCTGGCGGCCGCGAATTCGATATCATCGATG 3'

boli opäť teplotne hybridizované a ligované do pTCRNeo rozštiepeného XhoI a vyplneného dT. Výsledný plazmid pTCSLNeo s polylinkérom, ktorý je zložený z väčšieho počtu miest pre reštrikčné enzýmy v tejto orientácii:

5' XhoI/XbaI/ApaI/PvuII/NotI/EcoRI/EcoRV/ClaI 3' je vhodný na vloženie génu, ktorý je predmetom záujmu, s cieľom expície. Gén neo^r môže byť rovnako dobre zmenený na iné selekčné markérové gény.

Konštrukcia expresného vektora pTCSLDHFR

Gén neo^r v pTCSLNeo sa odstráni pomocou štiepenia reštrikčným enzýmom HindIII a BamHI a religuje s fragmentom génu myšacej mutantnej DHFR (dihydrofolát reduktáza) (DHFR) vytvoreným štiepením HindIII a BamHI plazmidu pSV2-DHFR, získaného od Dr. Paula Berga (Departament of Biochemistry, Stanford Universtiy Medical School).

Popis plazmidu pSV184 H-Neo/DNS-V_{kapa}C_{kapa}

Plazmid pSV184 deltaH-Neo/DNS-V_{kapa}C_{kapa} (získaný od Dr. Le Herzenberga, Standford Universtiy Medical School - pozri diplomová práca Jefferyho Dangla, str. 48 až 67) predstavuje myšací V a humánný C chimerický konštrukt, v ktorom bol prešmyknutý génový segment oblasti V-J kapa reťazca izolovaný z myšacieho hybridómu špecifického voči Denzylchloridu fúzovaný k humánnemu genómovému C_{kapa} fragmentu (pSV184 deltaH-Neo-C_{kapa}).

Izolácia konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca pomocou PCR

metódy

Použitím nerozštepeného plazmidu pSV184deltaH-Neo/-DNS-V_{kapa}C_{kapa} (pSVHuk), ktorý obsahuje konštantnú oblasť humánneho kapa reťazca, sa uskutoční PCR s dvoma primérmí (jedným forward a jedným reverzným) s cieľom izolácie konštantnej oblasti. Oligoméry (priméry) boli získané do firmy Operon. Ako reakčné činidlá pre PCR reakciu boli použité činidlá zo súpravy GeneAmp DNA Amplification Reagent Kit s AmplyTaq (Perkin-Elmer Cetus). Reakcie PCR boli uskutočňované pri troch rôznych koncentráciách horečnatých iónov. Alikvóty PCR produktov boli analyzované na 1% agarózovom géle. Bol vybraný PCR produkt z prvej vzorky (koncentrácia horečnatých iónov 1,5mM). Priméry lemujúce C oblasť boli navrhnuté tak, aby obsahovali miesta pre reštrikčné enzýmy pre účely klonovania. Amplifikovaná DNA bola teda rozštepená EcoRI (pri 3' konci). Miesto pri 5' konci (PvuII) rozštepené nebolo. Rozštepený fragment DNA bol potom rozdelený na 1% agarózovom géle a bol vyrezaný 300bp pás. DNA bola extrahovaná z gélu a malý alikvót bol analyzovaný na 1% agarózovom géle s cieľom kvalitatívnej analýzy a kvantitatívneho odhadu. 300bp pás sa zdal byť čistý a odhadnuté množstvo DNA bolo asi 140 ng.

Klonovanie konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca do vektora pBS KS⁺ a sekvenovanie

Fragment DNA konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca vyštepený EcoRI bol vložený do vektora pBS KS⁺, ktorý bol rozštepený SmaI a EcoRI použitím T4 DNA ligázy. Táto ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Boli odobrané jednotlivé kolónie a potom oli použité na inokuláciu 24 kvapalných kultúr. Z každej z týchto kultúr bola pripravená DNA. Každá vzorka DNA bola štepená PvuII (5' koniec C_{kapa}) a EcoRI (3' koniec C_{kapa}) a analyzovaný na 2% agarózovom géle. V dôsledku problémov pri separácii pásov (300 bp) boli vzorky DNA štepené len PvuII. Po analýze na 2% agarózovom géle vykazovalo 19 z 24 vzoriek správny C_{kapa} insert. Po sekvenovaní

boli zvolené vzorky č. 1 až 5 (z 19 správnych vzoriek). Sekvenovanie bolo uskutočnené použitím T7 a T3 primérov (sekvencie vo vektore lemujúce insert). Iné reakčné činidlá pre sekvenovanie pochádzali zo súpravy Sequenase Version 2.0 Kit (USB). Vzorka č. 5 vykazala správnu sekvenciu konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca.

Klonovanie konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca do cicavčieho expresného vektora pTCSLDHFR* za vzniku pTCSL_{kapa}DHFR*

Z vektora pBS KS (vzorka č. 5) bola použitím reštrikčných enzýmov PvuII EcoRI izolovaná konštantná oblasť humánneho kapa reťazca. S ohľadom na vyššie uvedené problémy s oddeľovaním pásov bolo však druhé štepenie uskutočnené s konštruktom pBS/Humánný C_{kapa}. Druhé štepenie zahrnovalo EcoRI a XbaI (boli umiestené v smere 5' vzhľadom na miesto PvuII) a tak bol získaný asi 300bp fragment. Tento fragment bol potom purifikovaný na géle a podrobený štepeniu PvuII, aby došlo k odstráneniu zvyšného malého fragmentu vektora pri 5' konci C_{kapa}. Tento výsledný fragment bol purifikovaný na géle a potom analyzovaný na 1% agarózovom géle s cieľom kvalitatívneho posúdenia a odhadu množstva. Ukázalo sa, že C_{kapa} DNA predstavuje čistý pás (asi 280bp) a jeho celkové množstvo bolo odhadnuté na asi 135 ng.

V dôsledku prítomnosti troch miest EcoRI v expresnom vektore pTCSLDHFR* bolo rozhodnuté, že najlepšie bude klonovanie len do miesta PvuII. Keďže bola C_{kapa} DNA pripravená štepením pomocou PvuII-EcoRI, bol EcoRI koniec opravený (za vytvorenia tupého konca) použitím Klonowovho fragmentu. Opravená C_{kapa} DNA s tupým koncom bola ligovaná do vektora pTCSLDHFR*, ktorý bol štepený PvuII a spracovaný fosfatázou (použitím fosfatázy z čriev teľaťa). Táto ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Boli odobrané jednotlivé kolónie a potom boli použité na inokuláciu 24 kvapalných kultúr. Z každej z týchto kultúr bola pripravená DNA. Každá vzorka DNA bola štepená PvuII a HindIII a analyzovaná na 1% agarózovom géle. Bolo zistené, že 5 vzoriek z 24 obsahovalo C_{kapa} insert v správnej

orientácii. Pre ďalšie pokračovanie bola použitá vzorka č. 7.

Nahradenie mutantného génu DHFR* génom DHFR divokého typu

Pre expresiu vektora pTCSLC_{kapá} DHFR* v bunkách CHO (dhfr-)DUX B11 bol gén DHFR* nahradený génom DHFR. DNA z pTCSLC_{kapá} DHFR* (vzorka č. 7), ako aj z pSV2-DHFR (plazmid získaný od Dr. Paula Berga z Department of Biochemistry, Stanford University Medical School) bol štepený restriktívnymi enzýmami HindIII a BglII s cieľom izolácie príslušných génových fragmentov. Po analýze bolo zistené, že prídavné miesto BglII vo vektore pTCSLC_{kapá} DHFR* odstránilo tiež časť miesta polyA, čo by mohlo interferovať s funkciou vektora. Preto boli štiepenia opakované použitím HindIII a BamHI. Časť (DHFR*)pTCSLC_{kapá} tohto vektora bola spracovaná fosfatázou. Potom boli izolované fragmenty (pTCSLC_{kapá} a DHFR) purifikované na géle a analyzované na 1% agarózovom géle (kvalitatívne a pre odhad kvantity). Obidva pásy sa zdali byť čisté a ich odhadnutá koncentrácia je podobná, t.j. asi 40 a asi 50 ng/ml. Gén DHFR bol ligovaný do vektora pTCSLC_{kapá} použitím T4 DNA ligázy. Táto ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Boli odobrané jednotlivé kolónie a potom bolo použité na inokuláciu 24 kvapalných kultúr. Z každej z týchto kultúr bola pripravená DNA. Každá vzorka DNA bola analyzovaná štepením restriktívnymi enzýmami HindIII a BamHI. Bolo zistené, že 23 vzoriek z 24 obsahovalo správny pás ukazujúci vloženie génu DHFR do vektora pTCSLC_{kapá}. Pre ďalšie pokračovanie bola použitá vzorka č. 22.

In vitro mutagenéza na konštrukt CDR štepených oblastí V s humánnou základnou štruktúrou

Konštrukcia humanizovaných variabilných génov

Humanizovaný gén VH bol skonštruovaný pomocou miestne orientovanej mutagenézy templátu M13 VHPCR1, ktorý obsahuje syntetický gén VH s oblasťami základnej štruktúry proteínu NEWM humánneho myelómu (pozri Jones et al., 1986). Jednoreťazcová

templátová DNA bola pripravená z M13 VHPCR1 pestovaného v dut.,ung. E. coli kmeňa RZ1032, aby templátová DNA obsahovala uracil namiesto tymínu. Boli syntetizované mutagénne oligonukleotidové priméry na kódovanie oblastí CDR TM23 a približne 15 bp perfektne zodpovedajúcej lemovacej sekvencie na každej strane. Ak sekvencia CDR TM23 zodpovedala templátovej sekvencii, boli použité kratšie oligonukleotidové priméry. Boli použité tieto priméry:

CDR1

5' TGGCTGTCTCACCCAGTTTACACCATAGGCGGTTAATGAGAAGCCAGACACGG 3',

CDR2

5' TGCTGGTGTCTTTTCAGCATTGTCACTCTGGATTTGAGAGCTGAATTATAGTCT
GTATTTCCATCACCCCATATCATTCCAA^T/c_oCCACTCAAGACC 3',

a CDR3

5' CCAGTAGTCCATAGCATAGAGGGTAGCCGTAACCCTATCTCTTG
CACATAATAG 3'.

Oligonukleotidový primér pre CDR bol predĺžený pri 3' konci, aby zahrnoval požadované zvyšky v polohách 27 až 30. Bol vytvorený zmesový oligonukleotid pre CDR2 a ten bol pri 3' konci CDR predĺžený buď G alebo T v polohe bázy 402 VH za vzniku dvoch alternatívnych kodónov, takže poloha 48 VH bola zmenená na L alebo I. Oligonukleotidy (vždy 10 pmol) boli fosforylované 5 jednotkami T4 polynukleotidkinázy v celkovom objeme 50 mikrolitrov pri 37 °C 1 hodinu. Jeden pmol každého mutagénneho priméru a pmol M13 sekvenačného priméru 3' vzhľadom na gén V bolo teplotne hybridované k 0,5 mikrogramu templátu v celkovom objeme 20 mikrolitrov pomocou 30-sekundového zahrievania na 90 °C, rýchleho ochladenia na 70 °C a pomalého zahriatia na 37 °C. Teplotne hybridizované priméry boli potom predlžované a ligované s prídavkom T7 DNA polymerázy a T4 DNA ligázy a inkubované jednu hodinu pri teplote miestnosti. Templátová DNA obsahujúca uracil bola odstránená pomocou spracovania DNA jednou jednotkou uracil DNA glykozylázy pri 37 °C počas 1 hodiny, pričom bol získaný neporušený mutovaný reťazec. Táto DNA bola amplifikovaná PCR a potom analyzovaná pomocou elektroforézy na agarózovom géle aby

sa potvrdilo, že bola vytvorená DNA so správnou veľkosťou. Táto DNA bola rozštiepená HindIII a BamHI a ligovaná do miest HindIII a BamHI M13mp19.

Podobne bol skonštruovaný pretvorený gén TM23 VK (TM23HuVK) mutagenézou M13 fágového templátu obsahujúceho sekvenciu DNA génu VK s oblasťou základnej štruktúry humánneho Bence-Jonesovho proteínu REI. Ten bol získaný z M13 VKPCR1, ktorý bol použitý pri konštrukcii chimerického ľahkého reťazca s odstránenými miestami pre reštrikčné enzýmy PvuII a BclI použitými na klonovanie. Boli použité tieto priméry:

CDR1

5' TCTGCTTGGTACCAGTTTAAATAATTGCTAATGCCCTGACTT
GCACTACAGGTGATGGTC 3',

: CDR2

5' TCTGCTTGGCACACCTGAGTGTAAGTGTAGTAGATCAGCAGCTT 3',

a. CDR3

5' CCCTTGGCCGAACGTCCGAGGAAGTTTACTATACTGCTGGCAGTAGTAG 3'.

Boli získané PCR produkty s očakávanou veľkosťou, 823 bp pre obidva VH a 620 bp pre VK a klonované do vektora M14mp19.

Overenie sekvencií DNA humanizovanej variabilnej oblasti

Bolo potvrdené, že boli vložené požadované oblasti CDR že nedošlo k žiadnym nesprávnym zmenám a že boli skonštruované správne humanizované VH a VK gény. Úplné variabilné oblasti boli sekvenované pomocou dideoxymetódy použitím T7 DNA polymerázy alebo Sequenase. Klony poskytujúce očakávanú sekvenciu dvoch VH boli selektované a označené názvami M13 TM23NMVH a M13 TM23NMVHL. Bol selektovaný klon č. 11 poskytujúci očakávanú sekvenciu pretvoreného VK a tento klon bol označený názvom M13 TM23HuVK.

Klonovanie prešmyknutých oblastí V myelómových expresných vektorov

(Klonovanie humanizovaných variabilných oblastí TM23 do expresných vektorov)

Klonované humanizované variabilné oblasti boli prenesené do expresných vektorov obsahujúcich gény humánnej konštantnej oblasti pre nasledujúcu expresiu protilátky v cicavčích bunkách. Z M13 TM23NMVH a M13 TM23NMVHL boli izolované dva humanizované VH gény ako fragmenty HindIII až BamHI a tieto fragmenty boli ligované do HindIII a BamHI miest expresného vektora ťažkého reťazca, pSVGPT.HuIgG1.

Z M13 TM23Hu VK bol izolovaný humanizovaný VK gén ako fragment HindIII až BamHI a tento fragment bol ligovaný do miest HindIII a BamHI expresného vektora ľahkého reťazca, pSVhvg.HuCK.

Restričknoenzýmová analýza ukázala, že dva alternatívne VH boli správne vložené do vektora ťažkého reťazca za vzniku plazmidov pSVgptTM23NMVH.HuIgG1 a pSVgptNMVHL.HuIgG1.

Podobne bol humanizovaný VK správne vložený do vektora ľahkého reťazca za vzniku plazmidu pSVhygTM23HuVK.HuCK.

Kotransfekcia konštruktov H a L reťazca do buniek NSO

Kotransfekcia génov humanizovaného ťažkého a ľahkého reťazca

Humanizované expresné plazmidy boli prenesené do línii cicavčích buniek NSO a P3-8.653F8879.

Humanizované expresné plazmidy boli kotransfekované do buniek NSO a P3-8.653F8879 použitím rovnakých postupov, aké boli použité pre chimerické expresné plazmidy. Dva plazmidy s humanizovaným ťažkým reťazcom pSVgptTM23NMVH.HuIgG1 a pSVgptNMVHL.HuIgG1 boli kotransfekované s plazmidom humanizovaného ľahkého reťazca pSVhygTM23HuVK.HuCK za vzniku bunkových línii exprimujúcich dva alternatívne humanizované protilátky, t.j. TM23HuVHua TM23HuVHL/HuVK. Tieto expresné plazmidy boli tiež kotransfekované v kombinácii s chimerickými expresnými plazmidmi za vzniku bunkových línii exprimujúcich

hybridné protilátky TM23HuVH/MuVK, TM23HuVHL/MuVK a TM23MuVHL/HuVK. Tieto hybridné protilátky predstavovali dôležitý prostriedok na zistenie príčiny akýchkoľvek väzbových defektov ako k ťažkému, tak aj ľahkému reťazcu v humanizovanej protilátke.

Po 14 dňoch po transfekcii boli kolónie NSO buniek pozorovateľné vo všetkých rôznych plazmidových kombináciách. Zo všetkých zaočkovaných misiek bola získaná len jedna jedná kolónia buniek P3-8.653F8879 a tieto boli teda vyhodené.

Selekcia pozitívnych klonov humánneho IgG1/kapa

Selekcia buniek produkujúcich humánnu protilátku

Boli izolované bunkové línie NSO produkujúce humanizovanú a hybridnú chimerickú/humanizovanú protilátku. Vzorky supernatantu z jamiek obsahujúcich bunkové kolónie boli podrobené skúške ELISA.

TM23HuVH/HuVK: Boli selektované bunky NSO zo 4 jamiek, v ktorých supernatant kultúry poskytol najvyššiu hodnotu pri stanovení ELISA; D5, D10, C6 a E11. Jamka D5 obsahovala dve viditeľné kolónie, ostatné jamky jednu. Bunkové línie produkované z týchto kolónií však nutne nemuseli byť klonálne. Bunkové línie z týchto jamiek boli kultivované a zmrazené v kvapalnom dusíku a označené TM23HuVH/HuVK D5, D10, C6 a E11.

TM23HuVHL/HuVK: Boli selektované bunky NSO zo 4 jamiek, v ktorých supernatant kultúry poskytol najvyššiu hodnotu pri stanovení ELISA; B2, B7, D8 a E9. Jamka E9 obsahovala dve viditeľné kolónie, ostatné jamky jednu. Bunkové línie produkované z týchto kolónií však nutne nemuseli byť klonálne. Bunkové línie z týchto jamiek boli kultivované a zmrazené v kvapalnom dusíku a označené TM23HuVHL/HuVK B2, B7, D8 a E9.

TM23HuVH/MuVK: Boli selektované bunky NSO zo 4 jamiek,

v ktorých supernatant kultúry poskytol najvyššiu hodnotu pri stanovení ELISA; D9, E6, F10 a G10. Jamky F10 a G10 obsahovali dve viditeľné kolónie, ostatné jamky jednu. Bunkové línie produkované z týchto kolónií však nutne nemuseli byť klonálne. Bunkové línie z týchto jamiek boli kultivované a zmrazené v kvapalnom dusíku a označené TM23HuVH/MuVK D9, E6, F10 a G10.

TM23HuVHL/MuVK: Boli selektované bunky NSO zo 4 jamiek, v ktorých supernatant kultúry poskytol najvyššiu hodnotu pri stanovení ELISA; B8, C6, D2 a D8. Jamky C6 a D8 obsahovali dve viditeľné kolónie, ostatné jamky jednu. Bunkové línie produkované z týchto kolónií však nutne nemuseli byť klonálne. Bunkové línie z týchto jamiek boli kultivované a zmrazené v kvapalnom dusíku a označené TM23HuVHL/MuVK B8, C6, D2 a D8.

TM23MuVH/HuVK: Boli selektované bunky NSO zo 4 jamiek, v ktorých supernatant kultúry poskytol najvyššiu hodnotu pri stanovení ELISA; B9, G4, C6 a G11. Všetky jamky obsahovali prinajmenšom 4 viditeľné kolónie. Bunkové línie produkované z týchto kolónií však nutne nemuseli byť klonálne. Bunkové línie z týchto jamiek boli kultivované a zmrazené v kvapalnom dusíku a označené TM23MuVH/HuVK B9, G4, C6 a G11.

Syntéza prvého reťazca cDNA s cieľom expresie buniek CHO

Príprava cytoplazmatickej DNA

Bola pripravená RNA pre reverznú transkripciu. Nádob s bunkami NSO TM23 HuVHL/HUVK bola vybraná z kvapalného dusíka a bunky boli ponechané rýchle sa roztopiť pri 37 °C. Potom boli bunky postupne zriedené 10 ml Dulbeccom modifikovaného Eaglovho média/Ham F12 (DMEM/F12) doplneného antibiotikami a 5 % fetálneho telacieho séra neobsahujúceho gamaglobulín (FBS bez GG). Bunky boli odstredené pri frekvencii otáčania 1 500 min⁻¹ (5 minút), médium bolo odstránené a bunky boli resuspendované v 20 ml čerstvého média v nádobe 75 cm². Potom bola kultúra expandovaná na 30 ml v nádobe 175 cm². Aktívne rastúce bunky boli zozbierané pomocou centrifugácie a trikrát premyté chladným roztokom

chloridu sodného pufrovaným fosforečnanom (PBS). Cytoplazmatická RNA bola z buniek pripravená spôsobom, ktorý popísali Favoloro et al. (1980). Celkovo sa získalo 350 mikrogramov cytoplazmatickej RNA.

Syntéza cDNA

Prvý reťazec cDNA bol pripravený pre oblasť VH a VK. cDNA variabilné oblasti prvého reťazca boli syntetizované pomocou reakcií pri použití 5 mikrogramov RNA, 250 mikrom deoxynukleotidtrifosfátov (dNTP), 15 jednotiek inhibítora ribonukleázy (Pharmacia RNAGuard) a 25 pmol oligonukleotidového priméru. Pre VH bol ako primér použitý oligo 1109

5' GGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACC 3'

a pre VK bol ako primér použitý oligo 1095

5' AGATTTTCAGCTGCTCATCAGATGGCGGAAGATGAAGACAGATGG 3'.

Reakčná zmes bola zahrievaná na 70 °C 10 minút a potom pomaly ochladená na 37 °C. Bolo pridaných 100 jednotiek reverznej transkriptázy z vírusu myšacej leukémie Moloney a reakčné zmesi boli inkubované 30 minút pri 37 °C.

cDNA boli amplifikované pomocou PCR použitím vyššie uvedených primérov v spojení s oligo 1096 pre VH

5' GCCGCTCGAGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAG 3'

a oligo 1094 pre VK

5' GCCGCTCGAGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTT
GGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGACATCCAGATGACCCAGAG 3'.

Produkty PCR boli podrobené skúšaniam pomocou elektroforézy na agarózovom géle a bolo zistené, že majú očakávanú veľkosť (približne 450 bp). Pásy DNA boli purifikované z gélu.

Štepenie pomocou reštrikčných enzýmov

Produkty PCR boli štepené s cieľom klonovania do vektorov

CHO. VH PCR produkt bol štepený XhoI a ApaI. VK PCR produkt bol štepený XhoI a PvuII. Vzorky rozštiepených DNA boli podrobené elektroforéze na 0,8% agarózovom géle. Boli pozorované pásy s očakávanou veľkosťou 450 bp.

Izolácia oblastí V [V_H (TCS a S) a V_{kapa} (S)] z cDNA PCR pomocou amplifikácie V_H (TCS)

Boli získané vzorky cDNA prvého reťazca TM27 V_{kapa} a TM27 V_H , ako aj oligonukleotidové priméry použité na amplifikáciu týchto molekúl pomocou PCR. PCR použitím TM27 V_H cDNA a vhodných primérov bola uskutočnená pomocou Taq polymerázy. Produkt bol spracovaný na agarózovom géle a purifikovaný použitím súpravy GeneClean II (Bio101). Získané množstvo bolo odhadnuté na 1,5 ng/ml.

Transfekcia buniek CHO pomocou pSR1Neo4H11 (ľahký) a pBJ14H11 (ťažký) s cieľom izolácie cDNA oblasti C

Cicavčie expresné vektory pSR1Neo a pBJ1: sú deriváty pcDL-SRa296 (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466), ako to je popísané v Lin et al. (1990) Science 249: 677, pričom miesto XhoI ležiacej medzi promotorom SRalfa a polyadenylačným miestom SV40 bolo s cieľom ľahšieho klonovania génu nahradené polylinkérom obsahujúcim tieto reštrikčné miesta:

5' XhoI/XbaI/SfiI/NotI/EcoRI/EcoRV/HindIII/ClaI 3'

Do pSR1Neo bol vložený gén rezistencie voči noemycínu medzi gén rezistencie voči ampicilínu a promotor SRalfa. cDNA kódujúca vedúcu sekvenciu a oblasť V-D-J ťažkého reťazca TM23 bola najprv fúzovaná ku konštantnej oblasti ťažkého reťazca genómu a potom nasledovalo vloženie do vektora pBJ1 rozštiepeného XhoI a NotI za vzniku pBJ14H11 (ťažký). Podobne bola cDNA kódujúca vedúcu sekvenciu a oblasť V-J ľahkého reťazca najprv fúzovaná ku genómovému fragmentu kapa a potom nasledovalo vloženie do vektora pSR1Neo rozštiepeného XhoI a NotI za vzniku pSR1Neo4h11 (ľahký). Tieto dva plazmidy, pBJ14H11 (ťažký) a pSR1Neo4h11 (ľahký), boli potom kotransfekované do buniek COS-7 (bunková línia z ľadvín

opice *Cercopithecus aethiops sabaeus* transformovaná SV40, ATCC CRL 1651) s cieľom tranzientnej expresie.

Izolácia konštantnej oblasti humánneho IgG1

cDNA konštantnej oblasti humánneho IgG1 bola pripravená z poly(A)⁺RNA izolovanej z transfekovaných buniek COS pomocou PCR použitím primérov konštantnej oblasti IgG1:

forward primér:

5' GCGTGACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC 3'

a reverzný primér:

5' GCGTGACAAGAATTCTCATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTT 3'.

PCR fragment DNA konštantnej oblasti s miestom EcoRI pri 3' konci (lemujúcom kódujúcu oblasť) a miestom ApaI pri 5' konci (v kódujúcej oblasti) bol klonovaný do plazmidu pBS KS⁺ s cieľom subklonovania a sekvenovania. Celá konštantná oblasť bola sekvenovaná použitím primérov T3 a T7 doplnených internými primérami konštantnej oblasti. Klon so správnou sekvenciou bol subklonovaný do plazmidu pTCSLNeo za vzniku plazmidu pTCSLCg1Neo.

Konštrukcia plazmidu pTCSLCg1Neo

Klon IgG1Cg1 so správnou sekvenciou VpBS KS⁺ bol rozštepovaný použitím reštrikčných enzýmov EcoRI a ApaI a ligovaný do PTCSNeo rozštepeného rovnakými enzýmami. Výsledný plazmid, pTCSLCg1Neo bol použitý pre ďalšiu modifikáciu vedúcu k pTCSLCg1NeoApa.

Eliminácia miesta ApaI v pTCSLC_{kapá}1Neo za vzniku pTCSLC_{kapá}-1NeoApa.

Expresný vektor pTCSLC_{kapá}1Neo-CHO obsahuje dve miesta pre reštrikčný enzým ApaI: jedno leží v oblasti polylinkéru a toto miesto bolo použité na vloženie klonovaných fragmentov. Druhé miesto leží práve vedľa génu neo^r v smere 3+. Kvôli zjednodušeniu nasledujúcich klonovacích stupňov sa miesto ApaI v blízkosti neo^r

eliminuje. Plazmid pTCSLC_{kapa}1Neo sa čiastočne rozštepí ApaI. Malý alikvót získaného produktu sa analyzuje na agarózovom géle s cieľom preverenia prítomnosti lineárnych molekúl (t.j. plazmidov rozštepených len v jednom z dvoch miest ApaI). Na rozštepený materiál sa potom pôsobí T4 DNA polymerázou, pomocou ktorej sa selektívne odstráni jednoreťazcové predĺženie zanechané ApaI, bez toho aby došlo k rozštepeniu dvojreťazcovej DNA. Plazmidy boli potom recirkularizované ligáciou a transformované do HB101 kompetentných buniek E. coli. Bolo izolovaných 30 transformantov a pomocou týchto transformantov boli inokulované kvapalnú kultúru. Z každej kultúry bola pripravená DNA a po rozštepení ApaI bola podrobená skúšaniam na agarózovom géle. Pri týchto štepeniach bola bohužiaľ plazmidová DNA degradovaná. Štepenie ApaI bolo opakované na 21 z 30 vzoriek. Dva izoláty (č. 4 a 12) sa zdali byť linearizované pôsobením ApaI, zatiaľ čo všetky ostatné boli rozštiepené v dvoch miestach. Dvaja kandidáti týchto klonov boli potom rozštepení ApaI a HindIII aby sa zistilo, ktoré miesto ApaI bolo prítomné. Pri tejto skúške sa zistilo, že bolo eliminované (tak, ako to bolo požadované) miesto ApaI umiestené v smere 3' k neo^r v pTCSLC_{kapa}1NeoApa (izolát č. 12). Boli uskutočnené ešte ďalšie reštrikčné štepenia, ktoré potvrdili štruktúru tohto izolátu.

Klonovanie oblastí V humánneho kapa a ťažkého reťazca izolovaných PCR do vektorov CHO, pTCSLC_{kapa}DHFR a pTCSLCg1NeoApa

Klonovanie fragmentu TM27 V_{kapa} do pTCSLC_{kapa}DHFR

cDNA oblasti V kapa reťazca pre TM27 bola purifikovaná na géle a rozštepená pomocou príslušných reštrikčných enzýmov. Malý alikvót vzorky DNA bol analyzovaný na 1% agarózovom géle kvôli odhadu kvantity a overeniu kvality. Prídavný pás (zodpovedajúci nečistote) bol pozorovaný pri asi 800 bp a koncentrácia bola odhadnutá na 1,25 ng/ml. Oblasť V bola ligovaná do vektora pZCSLC_{kapa}DHFR, ktorý bol rozštepený reštrikčnými enzýmami XhoI a PvuII a spracovaný fosfatázou. Ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Výťažok

kolónií transformantov bol veľmi nízky. Jednotlivé kolónie boli zozbierané a boli použité na inokuláciu 12 kvapalných kultúr. Z každej z nich bola pripravená DNA a tá bola potom rozštiepená XhoI a PvuII a analyzovaná na 1% agarózovom géle. Boli získané dve pozitívne vzorky, vzorka č. 3 a 4. Obidve tieto pozitívne vzorky boli sekvenované.

Klonovanie fragmentu V_H TM27 do pTCSLC_{kapá}1NeoApa.

PCR produkt zodpovedajúci oblasti V_H TM27 bol purifikovaný na géle a rozštiepený príslušnými reštrikčnými enzýmami (XhoI a ApaI). Keďže však bolo pozorované, že štiepenie ApaI zrejme neprebehne do konca, toto štiepenie bolo opakované. Malý alikvót bol analyzovaný na agarózovom géle s cieľom odhadu kvantity a overenia kvality. Koncentrácia pásu zodpovedajúceho oblasti V_H bola odhadnutá na 0,4 ng/ml. Tak ako to bolo v prípade fragmentu $V_{kapá}$, bol aj tu pozorovaný pás s dĺžkou asi 800 bp, čo ukazuje, že čistota tejto látky nezodpovedala predpokladom. Oblasť V_H bola ligovaná do vektora pTCSLC_{kapá}1NeoApa, ktorý bol rozštiepený reštrikčnými enzýmami XhoI a ApaI a spracovaný fosfatázou. Ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Bolo získaných veľmi málo transformantov. Zozbieralo sa 6 kolónií a všetky boli použité na inokuláciu kvapalných kultúr. Z každej z nich bol pripravený minipreparát DNA a ten bol štiepený XhoI a EcoRI a potom analyzovaný na agarózovom géle. Z prvej ligácie bol získaný jeden klon, pTCSLHuV_H4HC_{kapá}NeoApa (izolát č. 16). Aby sa získal väčší počet klonov prichádzajúcich do úvahy (v prípade, že by jediný izolát č. 6 neobsahoval správnu sekvenciu pri nasledujúcich skúškach) boli uskutočnené ďalšie ligácie použitím 1) V_H PCR produktu repurifikovaného na agaróze s nízkou teplotou topenia s cieľom odstránenia vysokomolekulárneho kontaminačného pásu a 2) V_H PCR produktu syntetizovaného použitím cDNA a primérov. Z týchto ligačných reakcií bolo získaných 8 ďalších transformantov, ktoré boli analyzované a z ktorých bolo vybraných 5 kandidátov ako klonov pre ďalší postup: izoláty č. 9, 10, 11, 21 a 14.

Sekvenovanie klonovaných oblastí V v obidvoch reťazcoch na potvrdenie očakávanej sekvencie DNA

Priméry navrhnuté na uľahčenie sekvenačnej analýzy DNA oblastí V vložených do vektorov pTCSLC_{kapá}1NeoApa[·] a pTCSLC_{kapá}DHFR boli získané od firmy Operon Research. Forward primér bol umiestený do sekvencií vektora pTCS a bol použitý na sekvenovanie V insertov ako vo vektore pTCSLC_{kapá}1NeoApa[·], tak aj pTCSLC_{kapá}DHFR. Reverzné priméry boli umiestené do sekvencie C_{kapá} alebo C_{kapá}1a boli použité na sekvenovanie V_{kapá} a V_H insertov.

Sekvenovanie dvojreťazcovej DNA oblasti V humánneho kapá reťazca

Dve vzorky TM23 (č. 3 a 4) boli sekvenované v obidvoch reťazcoch. Reverzný reťazec bol sekvenovaný úplne prostredníctvom miest pre reštrikčné enzýmy (3' - 5'; PvuII-XhoI) použitím priméru HUCK5PR. Sekvencia forward reťazca bola stanovená použitím dvoch rôznych primérov PTCSFOR a PTCSFWD. Skombinovaním sekvencií získaných použitím každého z primérov bola získaná sekvencia s plnou dĺžkou (Prostredníctvom miest pre reštrikčné enzýmy 5'-3; XhoI-PvuII). Bolo zistené, že vo forward reťazcoch existuje malá oblasť kompresie, ktorá nebola rozštepená ktorýmkoľvek z primérov, ani použitím sekvenačnej metódy, ktorá takéto kompresie znižuje. Reverzný reťazec však v tejto oblasti vykazoval správnu sekvenciu. Obidve vzorky č. 3 a 4 mali správnu sekvenciu. Pre transfekciu cicavčích buniek bola zvolená vzorka č. 4.

Sekvenovanie dvojreťazcovej DNA oblasti V gama reťazca TM27

Fragmenty V_H pTCSLHuV_HC_{kapá}1NeoApa[·] (izoláty č. 6 a 9) boli úplne sekvenované v obidvoch reťazcoch. Humanizovaný fragment V_H izolátu č. 6 zodpovedal očakávanej sekvencii v kódujúcej oblasti. Tento fragment obsahoval substitúciu jedného bázevého páru (C na T v polohe -2, vzhľadom na začiatočný ATG), od ktorej sa neočakávalo ovplyvnenie expresie. Fragment V_H izolátu č. 9

obsahoval v kódovacej oblasti dve substitúcie. Ďalšie štyri klony prichádzajúce do úvahy neboli sekvenované.

Kotransfekcia buniek COS a CHO TM27 a kontrolnými plazmidmi

Ako recipientné bunky boli použité bunky CHO dhfr⁻ DUX B11 a COS-1. Bunková línia CHO DUX B11 bola získaná do firmy Biogen Inc. Pre transfekciu buniek CHO bolo 5 mikrogramov plazmidov TM27 pTCSLHuV_κ4HC_κDHFR (izolát č. 4) a pTCSLHuV_H4HC_κ1NeoApa (izolát č. 6) linearizovaných a rovnako tak boli linearizované vektory pTCSLDHFRapa a pTCSLNeoApa, vždy štepením reštrikčnými enzýmami AatII. Plazmidy obsahujúce TM27 (označené ako "TM27L") boli koprecipitované v etanole a resuspendované vo vode. Podobne tiež vektorové plazmidy (označené ako "kontrola") boli koprecipitované a resuspendované vo vode. Každý z koprecipitovaných plazmidov bol pomocou elektroporácie transfekovaný do 10⁷ buniek CHO použitím zariadenia BioRad Gene Pulser pri 250 V a 960 mF. Transfekované bunky boli potom pestované v alfa minimálnom esenciálnom médiu (alfaMEM) doplnenom tymidínom, adenozínom a deoxyadenozínom (neselektívne médium) dva dni pred selekciou.

Pre transfekciu COS bolo 5 mikrogramov nerozštepených plazmidov TM27L a vektorových plazmidov koprecipitovaných v etanole a resuspendovaných vo vode. Plazmidy boli elektroporáciou transfekované do 4,1 x 10⁶ buniek COS. Transfekované bunky boli pestované 3 dni v Dulbeccom modifikovanom Eagleovom médiu (DMEM) a potom boli supernatanty zozbierané pre ďalšie skúšanie.

Analýza supernatantov transfektantov COS pomocou humánnej IgG1 ELISA a farbením

Produkcia humánneho IgG v bunkách COS bola meraná pomocou humánnej IgG1 ELISA na supernatantoch bunkových kultúr. Mikrotitračné misky boli potiahnuté myšacím antihumánnym IgG1 Fc protilátkou v PBS a blokované v blokovacom pufri (1% BSA v PBS). Supernatanty boli pridané v 100 mikrolitrových vzorkách; vhodné

riedenia blokovacím pufrom boli uskutočňované podľa potreby. Zachytený IgG bol detegovaný konjugátom chrenovej peroxidázy a kozej antihumánnej Ig_{κ} protilátky a ďalej OPD (ortofenyléndiamínom). Supernatanty z TM27L-transfekovaných buniek COS vykazovali hladinu humánneho IgG 95 ng/ml. Humánný IgG z buniek COS transfekovaných kontrolou bol nedetegovateľný. Na supernatantoch buniek COS transfekovaných TM27L bola uskutočnená prietoková cytometria so šesťnásobným skoncentrovaním. Intenzita farbenia buniek HPB vyjadrená strednou kanálikovou fluroescenciou bola približne 9 x nižšia ako intenzita dosiahnutá purifikovanou TM27L (purifikovanou z buniek NSO) pri asi 2,5 mg/ml. Farbenie Jurkatových buniek zodpovedalo hodnote pozadia.

Selekcia transfektantov CHO

Transfektanty CHO boli umiestené s cieľom selekcie do média alfaMEM, ktoré nemalo nukleotidové prísady (pre selekciu DHFR⁺ na pTCSLHuV _{κ} 4HC _{κ} DHFR) a s obsahom Geneticínu (G418: pre selekciu neo^r na pTCSLHuV_H4HC _{κ} 1NeoApa). Bunky boli umiestené do 24-jamkovej misky v koncentrácii $2,0 \times 10^5$ buniek/ml.

Analýza supernatantov transfektantov CHO pomocou humánnej IgG1 ELISA

Po 12 dňoch v selektívnom médiu boli supernatanty z konfluentných jamiek zozbierané a podrobené skúšaniam ELISA použitím IgG1/ κ . Koncentrácia supernatantov TM27L ležala v rozmedzí od 182 do 236 ng/ml. Väčšinou bola nad 200 ng/ml. Humánný IgG1/ κ bol nedetegovateľný v supernatantoch kontroly. Bunky z 12 jamiek s vysokými producentmi TM27 boli expandované do baniek T25. Jednotlivé nádoby boli zmrazené ako kultúry "backup" a uskladnené pod kvapalným dusíkom. Tiež bunky z dvoch kontrolných jamiek boli expandované do baniek T25 a zmrazené.

Prvé nanášanie transfektantov CHO na misky s limitným riedením

Štyri jamky obsahujúce najväčšími producentmi boli zvolené

na nanášanie na 96-jamkové misky použitím limitného riedenia: bunky č. 1B1 (232,6 ng/ml), 1D6 (233,3 ng/ml), 2B2 (235,5 ng/ml) a 2C1 (236,0 ng/ml). Pre každú jamku boli použité tri misky so selektívnym médiom: 1 pri koncentrácii 1 bunka/jamka a 2 pri koncentrácii 0,5 bunky/jamka.

Supernatanty z prvého kola klonovania boli skúšané testom ELISA (IgG1/kapa). Bunky z 90 jamiek s vysokými producentmi boli expandované do 24 jamkových misiek a nechane rásť až do konfluencie. Supernatanty z 12 z týchto kultúr boli skúšané testom ELISA (humánnym IgG1/kapa) a prietokovou cytometriou. Koncentrácia pri teste ELISA (IgG1/kapa) ležala v rozmedzí od 211 do 1048 ng/ml. Všetky vzorky farbili HPB bunky (stredná kanáliková fluorescencia ležala v rozmedzí od 46,5 do 169,9) a nefarbili Jurkatove bunky. Šesť klonov, ktoré boli najväčšími producentmi, bolo expandovaných a zmrazených v kvapalnom dusíku. Z nich boli vybrané dva klony (1B1-C7 a 2B2-9H), ako najväčší producenti, s cieľom pokračovania v ďalších kolách klonovania.

Dve primárne kultúry kontrolných konštruktov boli tiež spracované v jednom kole nanášaním na 96-jamkové misky s limitným riedením. Pre expanziu bol vybraný vždy jeden klon. Supernatanty boli podrobené skúšaniam a zistilo sa, že neposkytujú žiadny detegovateľný signál pri ELISA (humánnym IgG1/kapa) (str. 640-83). Bunky boli zmrazené a potom uložené v kvapalnom dusíku.

Expanzia neklonovaných kultúr do mierky prevaľovaných fliaš pre purifikácie protilátky

Dve primárne kultúry (1B1 a 2B2) boli expandované s cieľom získania dostatočného množstva látky na purifikáciu protilátky TM27. Bunky expandované do dvojlitrových prevaľovaných fliaš a adaptované sérovou koncentráciou (cez T25 v 10% sére, ďalej T75 v 10% sére, ďalej 3 x T75 v 5% sére a nakoniec 3 x dvojlitrové fľaše v 1% sére) (str. 640-24). Dvojlitrové fľaše boli naplnené 1 deň a potom v nich bola 2, 5 a 8 deň nahradená vždy polovica objemu čerstvým médiom s jedným percentom séra. Prvý zber bol

uskutočnený 10 deň, druhý 12 a tretí 15 deň. Zozbierané supernatanty boli odstredené a až do purifikácie uložené pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Purifikácia protilátky na stípci s proteínom A

Supernatanty z kultúr 2B2 boli spojené (celkový objem 2,7 litra) a prefiltrované cez nylonovú membránu s otvormi pórov s veľkosťou 0,22 mikrometrov. Test ELISA (humánný IgG1) ukázal, že celkové množstvo východiskovej látky bolo 1 090 mg. Protilátka bola purifikovaná na stípci Prosep-A (proteín A), pričom elúcia bola uskutočňovaná 0,1M citrátom s pH 5,0, 4,0 a 3,0. Eluáty boli dialyzované do PBS. Množstvo purifikovanej protilátky v eluovaných frakciách bolo merané testom ELISA (humánný IgG1). Frakcia s pH 3,0 obsahovala väčšinu purifikovanej protilátky. Malé množstvo protilátky bolo zistené vo frakcii s pH 4,0. Skúška ELISA (humánný IgG1) bola opakovaná, aby sa získali presnejšie koncentračné údaje. Celkový výťažok TM27 (s frakciou s pH 3,0 a 4,0 spolu) bol 960 mg.

Purifikácia protilátok zo supernatantu kultúry NSO transfektantu na proteíne A

Protilátky zo supernatantu kultúry transfektantu NSO boli purifikované na stípci s proteínom A v podstate pomocou vyššie uvedeného spôsobu.

Charakterizácia protilátky TM27 z NSO myelómových bunkových líní

TM27 mAb purifikované zo supernatantov kultúry NSO transfektantov použitím chromatografie na stípci s proteínom A bola použitá na farbenia buniek HPB-ALL (Vbeta 5.2) a Jurkatových buniek (Vbeta 8.1), ako negatívna kontrola, v porovnaní s myšacou mAb, TM23 a chimerickou TM27. TM27 farbila HPB-ALL, ale nie Jurkatove bunky.

Aby sa stanovila špecificita TM27 boli normálne PBL T-bunky

farbené TM27 v porovnaní s TM23 mAb. Ako TM27, tak aj TM23 mAb farbila 3,0 % všetkých humánných PBL T-buniek. Bola uskutočnená kompetetívna skúška, pri ktorej bola k neznačenej 4H11 alebo TM27 mAb (v rôznej koncentrácii) pridaná konštantná koncentrácia TM23 mAb značenej FITC. Aby sa stanovilo, či TM27 môže komodulovať s CD3 antigénom, môžu byť bunky HPB-ALL inkubované s rôznymi koncentráciami TM27 alebo TM23 mAb (cez noc) a potom farbené anti-CD3 mAb. Výsledky ukázali, že ako TM27, tak aj TM23 môže vyvolať endocytózu komplexu TCR/CD3.

Aby sa zmerala väzbová afinita TM27 na HPB-ALL bunky, bola uskutočnená Scatchardova analýza. Ako pri Scatchardovej, tak aj pri kompetetívnej skúške (s T23 mAb) výsledky ukázali, že TM27 si uchovala približne rovnakú afinitu ($K_d = 2,0 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$) a bola schopná dobre súťažiť s 4H11 mAb.

Bolo tiež uskutočnené porovnanie TM27L/NSO a TM27L/CHO pri kompetetívnej skúške s 4H11 a výsledky sú znázornené na obr. 3. Tiež bola uskutočnená Scatchardova analýza a jej výsledky sú znázornené na obr. 4.

Druhé nanášanie CHO transfektantov na misky s limitným riedením

Nanášanie na misky s limitným riedením bolo uskutočnené pomocou vyššie popísaného spôsobu. Jamky boli podrobené screeningu pomocou testu ELISA (humánný IgG1). Bunky z 6 jamiek (1B1 až C7 a 2B2 až H9) boli expandované do 24 jamkových misiek a podrobené testu ELISA (humánný IgG1). Dva klony, ktoré boli najväčšími producentmi z každej misky, boli expandované a zmrazené v kvapalnom dusíku. Klony, ktoré boli najväčšími producentmi z každej série, boli vybrané pre záverečné kolo subklonovania.

Tretie nanášanie CHO transfektantov na misky s limitným riedením

Nanášanie na misky s limitným riedením bolo uskutočnené pomocou vyššie popísaného spôsobu. Jamky boli podrobené

screeningu pomocou testu ELISA (humánný IgG1). Bunky z 6 jamiek (1B1 až C7 a 2B2 až H9) boli expandované do 24 jamkových misiek a podrobené testu ELISA (humánný IgG1). Tri klony, ktoré boli najväčšími producentmi z každej misky, boli expandované do baniek T25 a zmrazené v kvapalnom dusíku. Vždy jeden klon bol expandovaný do banky T75. V tomto okamihu bolo do banky prikvapkané médium s Geneticinom, čím sa odstránila selekcia na neo^r. Selekcia na DHFR bola zachovaná. Supernatanty boli skúšané testom ELISA (humánný IgG1). Klon 1B1-C7 produkoval 4,96 mg/10⁶ buniek/deň. Klon 2B2-H9 produkoval 2,65 mg/10⁶ buniek/deň. Izolát C7 bol teda vybraný ako konečný klon a izolát H9 bol označený ako klon alternatívny.

Príprava zásobných zmrazených buniek

Konečný klon bol expandovaný do piatich buniek T225, aby sa získal dostatočný počet buniek, ktorý by slúžil ako zásoba zmrazených buniek. Bunky boli zozbierané z baniek a spojené. Spojená suspenzia obsahovala 98,3 % životaschopných buniek. Celkový počet životaschopných buniek bol $1,58 \times 10^8$, čo bol počet dostatočný na prípravu požadovaného počtu 72 baniek pri koncentrácii buniek 2×10^6 /banka. Bunky boli zmrazené a označené skratkou "TM27L-662-35". Okrem toho bol tiež expandovaný alternatívny klon H9 do jednej banky T225 s cieľom prípravy malej zásoby zmrazených buniek. Bunky zozbierané z tejto banky boli životaschopné z 97,3 %. Suspenzia obsahovala dostatočný počet buniek pre prípravu 9,7 nádoby pri koncentrácii 2×10^6 buniek/nádoba (str. 662-89). Bunky boli zmrazené v kvapalnom dusíku a označené skratkou "TM27L-662-89".

Skúšanie buniek revitalizovaných zo zmrazenej nádoby

Životaschopnosť a mykoplazmatické skúšanie

Jedna nádoba so zmrazenými zásobnými bunkami TM27L-662-35 bola nechaná sa roztopiť a bunky boli regenerované v alfaMEM. Pomocou farbenia trypanovou modrou bolo zistené, že

životaschopnosť buniek je 88 %. Konfluentná kultúra, ktorá narástla z týchto buniek bola skúšaná na mykoplazmatickú kontamináciu použitím súpravy Bionique Testing Laboratories. Pri skúške nebola zistená žiadna kontaminácia. Tiež bola nechaná roztopiť sa jedna nádoba so zásobnými bunkami TM27L-662-89. Pomocou farbenia trypanovou modrou bolo zistené, že životaschopnosť buniek je 93,8 %. Konfluentná kultúra, ktorá narástla z týchto buniek bola skúšaná na mykoplazmatickú kontamináciu pomocou vyššie uvedeného spôsobu. Pri skúške nebola zistená žiadna kontaminácia. Obidve kultúry boli expandované do baniek T75 a supernatanty bunkovej kultúry boli skúšané testom ELISA (humánný IgG1). Klon TM27L-662-35 produkoval 3,24 mikrogramov/10⁶ buniek/deň a klon TM27L-662-89 produkoval 2,52 mikrogramov/10⁶ buniek/deň. Pri druhej skúške klon TM27L-662-35 produkoval 3,03 mikrogramov/10⁶ buniek/deň a klon TM27L-662-89 produkoval 2,74 mikrogramov/10⁶ buniek/deň.

Expresia TM27L-662-35 na mierku prevaľovaných fliaš pre purifikáciu protilátky

Kultúra TM27L-662-35 bola expandovaná s cieľom získania dostatočného množstva látky pre purifikáciu protilátky TM27L. Bunky boli expandované do dvojlitrových prevaľovaných fliaš a adaptované na nižšiu sérovú koncentráciu (cez T25 v 10% sére, ďalej T75 v 10% sére, ďalej 3 x T75 v 5% sére a nakoniec 3 x dvojlitrové fľaše v 1% sére) (str. 640-24). Dvojlitrové fľaše boli naplnené 1 deň a potom v nich bola 2, 7 a 9 deň nahradená vždy polovica objemu čerstvým médiom s jedným percentom séra. Prvý zber bol uskutočnený 12 deň, druhý 14 a tretí 16 deň. Zozbierané supernatanty boli odstredené, prefiltrované a až do purifikácie uložené pri teplote -70 °C.

Purifikácia protilátky na stĺpci s proteínom A

Supernatanty z kultúr TM27L-662-35 boli spojené (celkový objem 5,1 litra). Protilátka bola naviazaná na stĺpec Prosep-A (proteín A), pričom elúcia bola uskutočňovaná 0,1M citrátom s pH

5,0, a 3,0. Eluát s pH 3,0 bol dialyzovaný do PBS. Množstvo purifikovanej protilátky vo východiskovej látke a eluovaných frakciách bolo merané testom ELISA (humánný IgG1/kapa). Frakcia s pH 3,0 obsahovala približne 3,9 mg protilátky v 25 ml. Táto látka bola skoncentrovaná v koncentračnom zariadení Centriprep-30 (Amicon) a test ELISA (IgG1/kapa) bol opakovaný. Celkový výťažok TM27L bol asi 3,2 mg pri koncentrácii 1,6 mg/ml.

Primárna charakterizácia purifikovanej protilátky

Prietoková cytometria bola uskutočnená na asi 2,5mg vzorke látky ako z frakcie s pH 3,0, tak aj z frakcie s pH 4,0 a TM27 purifikovanej z buniek NSO. Intenzita farbenia buniek HPB vyjadrená strednou kanálikovou fluorescenciou bola: 283,46 (frakcia s pH 3,0), 321,98 (frakcia s pH 4,0) a 506,79 (TM27 získaná z NSO). Farbenie Jurkatových buniek bolo pre všetky vzorky na úrovni pozadia.

P r í k l a d 2

Porovnanie sekvencií CDR-štepéných protilátok TM27 s kazetami humánnej základnej štruktúry

TM27 V_K

```

1   DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNYLNWYQQTPGKAPKLLIYY 50
REI  -----Q-----D=IK-----E
TM23 -----TT-----L-----S-----K=DGTV-----
WAL  -----R-----S-----K-----A

51  TSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSKLPRTFGQ 100
REI  A=N=QA-----QS=Y-----
TM23 -----SL-----N=E-----G
WAL  A=Q=T-----F=L-----S-----SYSTLI-----

101  GTKLQIT
REI  -----
TM23 -----E=K
WAL  -----R=E=K

```

TM27 VH

1* QVQLQESGPGGLVLRPSQTL~~SLTCTVSGFSLTAYGVNHWVRQPPGRGLEW~~LGM 50
 NEWM ~~EQ-----STFSNDYYT-----IY~~
 TM23 ~~K-----A--S-I-----K-----~~
 HIL ~~K-VQA-G-V-Q-GRS-R-S-IA--TFSN--MH--A-K--VAV~~

51 IWGDGNTDYN~~SALKSRVTMLKDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV~~100
 NEWM VFYH-TS-DTTPLR-----V-----NLI
 TM23 ~~-----LSIS--N--S-VF-KMN-LQTD--R-----~~
 HIL ~~YN-S-Y-GDSV-G-F-ISR-N--RTLYM^RZMN-LRTE-----PD~~

101 TATLYAMDYWGQGS~~LTVSS~~ 120
 NEWM AGCIDV -----
 TM23 ~~-----TS-----~~
 HIL IL-AFSF-----VL-----

* HuVHL má L pre č. 48.

TM27L: s leucínom v polohe 48 ťažkého reťazca
 TM27I: s izoleucínom v polohe 48 ťažkého reťazca
 TM27.1: s FS na VF (78-79) zmenami
 TM27.2: s VTML/T na LSIS/N (67-70/73) zmenami
 TM27.3: s V na R (92) zmenami

P r í k l a d 3

Scatchardova analýza TM23

Príklad	Kd	Receptory/bunka
617:096	3,27e-8 M	3,04e5

617:115 2,30e-8 M 3,43e5
 617:119 2,46e-8 M 2,46e5

Stred

$K_d = 2,52 (\pm 0,67)e-8 \text{ M}$
 Receptory/bunka = 2,64e5

Scatchardova analýza TM27

Príklad	K_d	Receptory/bunka
613:78	1,48e-8 M	3,31e4
613:82	1,14e-8 M	2,47e4

Stred

$K_d = 1,31 (\pm 0,24)e-8 \text{ M}$
 Receptory/bunka = 2,98e4

P r í k l a d 4

Prehľad práce na TM27I

TM27II (48) v bunkách COS/CHO:

* Bola pripravená cDNA z CDR-štepených oblastí V v produkčnej línii HSO, táto cDNA bola amplifikovaná pomocou PCR a sekvenovaná.

* Fragменты DNA boli klonované do pTCSLNeo v cDNA konfigurácii.

* Plazmid bol kotransfekovaný s pTCSLDHFRTM27_{kapa} do buniek COS a CHO.

* Pozitívne výsledky pri teste ELISA na expresiu humánneho IgG1/kapa namerané v supernatantoch buniek COS ukázali, že boli získané správne plazmidové konštrukty.

* Bola uskutočnená selekcia expanzie a klonovanie transfektantov buniek CHO. Bunky boli po jednom klonovaní zmrazené v kvapalnom dusíku.

P r í k l a d 5

Dáta aminokyselinovej sekvencie získané z 16G8 cDNA

Ťažký reťazec:

10	20	30	40	50
*	*	*	*	*
TTRAP RSSHS VISTE HRPLT MDSRL NLVFL VLILK GVQCD VQLVE SGGGL				
60	70	80	90	100
*	*	*	*	*
VQPGG SRKLS CAASG FTFSN FGMHW VRQAP DKGLE WVAYI SSGSS TIYYA				
110	120	130	140	150
*	*	*	*	*
DTLKG RFTIS RDNPK NTLFL QMTSL RSEDY AMYYC ARRGE GAMDY WGQGT				
160	170			
*	*			
SVTVS SAKTT PPSVY PLAPG				

Ľahký reťazec:

10	20	30	40	50
*	*	*	*	*
ISQGT KFKYT MDFQV QIFSF LLISI SVVMS RGENV LTQSP AIMS A SLGEK				
60	70	80	90	100
*	*	*	*	*
VTMSC RASSS VNYIY WYQQK SDASP KLWIY YTSNL APGVP TRFSG SGSGN				
110	120	130	140	150
*	*	*	*	*
SYSLT ISSME GEDAA TYQCQ QFTSS PFTFG SGTCL EIKRA DAAPT VSIFP				

153

*

PSS

Sekvenačné dáta proteínu: H = DVQLVE?GGGLVQPG

L = ENVLTQ

P r í k l a d 6

Prehľad práce na TM29

* Boli pripravené hybridómy v podstate spôsobom popísaným v príklade 1 a bola izolovaná cDNA (znázornená v príklade 5).

* Izolované cDNA (H a kapa) (z hybridómu 16G8) boli klonované do vektorov M13.

* Pomocou mutagenézy bola zavedená humánna základná štruktúra ($VH_{kol.}/Vk_{REI}$).

* CDR-štepené oblasti V boli klonované do myelómových expresných vektorov.

* Humanizované protilátky (vždy asi 1 mg) boli purifikované z transfektantov NSO s cieľom predbežného vyhodnotenia.

Boli vyrobené 4 rôzne TM29.

TM29

TM29.1 s SS na AA (23-24) zmenami

TM29.2 s S na P (75) zmenou

TM29.3 s GV/F na AM/Y (92-93/95) zmenami

Podrobný popis experimentov vedúcich k TM29

Izolácia konštantnej oblasti humánneho reťazca kapa pomocou metódy PCR

Použitím nerozštepeného plazmidu pSV184DH-Neo/DNS- V_{kapa}^C (pSVHuk), ktorý obsahuje konštantnú oblasť humánneho kapa reťazca, sa uskutoční PCR s dvoma primérmí (jedným forward a jedným reverzným) s cieľom izolácie konštantnej oblasti.

Oligoméry (priméry) boli získané od firmy Operon. Ako reakčné činidlá pre PCR reakciu boli použité činidlá zo súpravy GeneAmp DNA Amplification Reagent Kit s AmplyTaq (Perkin-Elmer Cetus). Reakcie PCR boli uskutočňované pri troch rôznych koncentráciách horečnatých iónov. Alikvóty PCR produktov boli analyzované na 1% agarózovom géle. Bol vybraný PCR produkt z prvej vzorky (koncentrácia horečnatých iónov 1,5mM). Priméry lemujúce C oblasť boli navrhnuté tak, aby obsahovali miesta pre reštrikčné enzýmy pre účely klonovania. Amplifikovaná DNA bola teda rozštiepená EcoRI (pri 3' konci). Miesto pri 5' konci (PvuII) rozštiepené nebolo. Rozštiepený fragment DNA bol potom rozdelený na 1% agarózovom géle a bol vyrezaný 300bp pás. DNA bola extrahovaná z gélu a malý alikvót bol analyzovaný na 1% agarózovom géle s cieľom kvalitatívnej analýzy a kvantitatívneho odhadu. 300bp pás sa zdal byť čistý a odhadnuté celkové množstvo DNA bolo asi 140 ng.

Klonovanie konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca do vektora pBS KS⁺ a sekvenovanie

Fragment DNA konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca vyštiepený EcoRI bol vložený do vektora pBS KS⁺, ktorý bol rozštiepený SmaI a EcoRI použitím T4 DNA ligázy. Táto ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Boli odobrané jednotlivé kolónie a potom boli použité na inokuláciu 24 kvapalných kultúr. Z každej z týchto kultúr bola pripravená DNA. Každá vzorka DNA bola štiepená PvuII (5' koniec C_{kapa}) a EcoRI (3' koniec C_{kapa}) a analyzovaná na 2% agarózovom géle. V dôsledku ťažkostí pri separácii pásov (300 bp) boli vzorky DNA štiepené len PvuII. Po analýze na 2% agarózovom géle vykazovalo 19 z 24 vzoriek správny C_{kapa} insert. Na sekvenovanie boli zvolené vzorky č. 1 až 5 (z 19 správnych vzoriek). Sekvenovanie bolo uskutočnené použitím T7 a T3 primérov (sekvencie vo vektore lemujúce insert). Iné reakčné činidlá pre sekvenovanie pochádzali zo súpravy Sequenase Version 2.0 Kit (USB). Vzorka č. 5 vykazovala správnu sekvenciu konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca.

Klonovanie konštantnej oblasti humánneho kapa reťazca do cicavčieho expresného vektora pTCSLDHFR* za vzniku pTCSLC_{kapa}DHFR*

Z vektora pBS KS+ (vzorka č. 5) bola použitím reštrikčných enzýmov PvuII a EcoRI izolovaná konštantná oblasť humánneho kapa reťazca. S ohľadom na vyššie uvedené problémy s oddeľovaním pásov bolo však druhé štepenie uskutočnené s konštruktom pBS/Humánne C_{kapa}. Druhé štepenie zahrnovalo EcoRI a XbaI (boli umiestené v smere 5' vzhľadom na miesto PvuII) a tak bol získaný asi 300bp fragment. Tento fragment bol potom purifikovaný na géle a podrobený štepeniu PvuII, aby došlo k odstráneniu zvyšného malého fragmentu vektora pri 5' konci C_{kapa}. Tento výsledný fragment bol purifikovaný na géle a potom analyzovaný na 1% agarózovom géle s cieľom kvalitatívneho posúdenia a odhadu množstva. Ukázalo sa, že C_{kapa} DNA predstavuje čistý pás (asi 280bp) a jeho celkové množstvo bolo odhadnuté na asi 135 ng.

V dôsledku prítomnosti troch miest EcoRI v expresnom vektore pTCSLDHFR* bolo rozhodnuté, že najlepšie bude klonovanie len do miesta PvuII. Keďže bola C_{kapa} DNA pripravená štepením pomocou PvuII-EcoRI, bol EcoRI koniec opravený (pri vytvorení tupého konca) použitím Klenowho fragmentu. Opravená C_{kapa} DNA s tupým koncom bola ligovaná do vektora pTCSLDHFR*, ktorý bol štepený PvuII a spracovaný fosfatázou (použitím fosfatázy z čriev teľaťa). Táto ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Boli odobrané jednotlivé kolónie a potom boli použité na inokuláciu 24 kvapalných kultúr. Z každej z týchto kultúr bola pripravená DNA. Každá vzorka DNA bola štepená PvuII a HindIII a analyzovaná na 1% agarózovom géle. Bolo zistené, že 5 vzoriek z 24 obsahovalo C_{kapa} insert v správnej orientácii. Pre ďalšie pokračovanie bola použitá vzorka č. 7.

Nahradenie mutantného génu DHFR* génom DHFR divokého typu

Pre expresiu vektora pTCSLC_{kapa}DHFR* v bunkách CHO

(dhfr^r)DUX B11 bol gén DHFR* nahradený génom DHFR. DNA z pTCSLC_{kapá}DHFR* (vzorka č. 7), ako aj z pSV2-DHFR (plazmid získaný od Dr. Paula Berga z Department of Biochemistry, Stanford University Medical School) bol štepený reštrikčnými enzýmami HindIII a BglII s cieľom izolácie príslušných génových fragmentov. Po analýze bolo zistené, že prídavné miesto BglII vo vektore pTCSLC_{kapá}DHFR* odstránilo tiež časť miesta polyA, čo by mohlo interferovať s funkciou vektora. Preto boli štepenia opakované použitím HindIII a BamHI. Časť (DHFR*)pTCSLC_{kapá} tohto vektora bola spracovaná fosfatázou. Potom boli obidva izolované fragmenty (pTCSLC_{kapá} a DHFR) purifikované na géle a analyzované na 1% agarózovom géle (kvalitatívne a kvôli odhadu kvantity). Obidva pásy sa zdali byť čisté a ich odhadnutá koncentrácia je podobná, t.j. asi 40 a asi 50 ng/ml. Gén DHFR bol ligovaný do vektora pTCSLC_{kapá} použitím T4 DNA ligázy. Táto ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Boli odobrané jednotlivé kolónie a potom boli použité na inokuláciu 24 kvapalných kultúr. Z každej z týchto kultúr bola pripravená DNA. Každá vzorka DNA bola analyzovaná štepením reštrikčnými enzýmami HindIII a BamHI. Bolo zistené, že 23 vzoriek z 24 obsahovalo správny pás ukazujúci vloženie génu DHFR do vektora pTCSLC_{kapá}. Pre ďalšie pokračovanie bola použitá vzorka č. 22.

Klonovanie oblasti V humánneho kapá reťazca izolovanej PCR do CHO vektora do pTCSLC_{kapá}DHFR

cdNA oblasti V kapá reťazca pre 16G8 bola purifikovaná na géle a rozštepená príslušnými reštrikčnými enzýmami. Malý alikvót vzorky DNA bol analyzovaný na 1% agarózovom géle kvôli odhadu kvantity a overeniu kvality. Prídavný pás (zodpovedajúci nečistote) bol pozorovaný pri asi 800 bp a koncentrácia bola odhadnutá na 1,25 ng/ml. Oblasť V bola ligovaná do vektora pTCSLC_{kapá}DHFR, ktorý bol rozštepený reštrikčnými enzýmami XhoI a PvuI a spracovaný fosfatázou. Ligačná zmes bola použitá na transformáciu E. coli DH5alfa kompetentných buniek. Výťažok kolónií transformantov bol veľmi nízky. Jednotlivé kolónie boli

zozbierané a boli použité na inokuláciu 12 kvapalných kultúr. Z každej z nich bola pripravená DNA a tá bola potom rozštiepená XhoI a PvuII a analyzovaná na 1% agarózovom géle. Boli získané štyri pozitívne vzorky, vzorky č. 1, 4, 7 a 10. Všetky tieto pozitívne vzorky boli sekvenované. Oblasť V gama reťazca TM29 izolovaná PCR bola klonovaná do CHO vektora pTCSLCg1NeoApa.

Sekvenovanie dvojreťazcovej DNA oblasti V humánneho kapa reťazca

Štyri vzorky 16G8 (č. 1, 4, 7 a 10) boli sekvenované v obidvoch reťazcoch. Reverzný reťazec bol sekvenovaný úplne prostredníctvom miest pre reštrikčné enzýmy (3' - 5'; PvuII-XhoI) použitím priméru FUCK5PR. Ukázalo sa, že vzorky č. 1 a 4 majú správnu sekvenciu, pokiaľ ide o vzorku č. 7 nedošlo k sekvenovaniu a vzorka č. 10 mala zlú sekvenciu. Sekvencia forward reťazca vzorky č. 1 a 4 bola stanovená použitím dvoch rôznych primérov PTCSFOR a PTCSFWD. Skombinovaním sekvencií získaných použitím každého z primérov bola získaná sekvencia s plnou dĺžkou (prostredníctvom miest pre reštrikčné enzýmy 5'-3; XhoI-PvuII). Bolo zistené, že vo forward reťazcoch existuje malá oblasť kompresie, ktorá nebola rozštiepená ktorýmkoľvek z primérov, ani použitím sekvenačnej metódy, ktorá takéto kompresie znižuje. Reverzný reťazec však v tejto oblasti vykazoval správnu sekvenciu. Obidve vzorky č. 1 a 4 mali správnu sekvenciu. Pre transfekciu cicavčích buniek bola zvolená vzorka č. 4.

Kotransfekcia buniek COS a CHO plazmidmi s ľahkým a ťažkým reťazcom TM27

Ako recipientné bunky pre kotransfekciu plazmidov s ľahkým a ťažkým reťazcom TM29 boli použité bunky COS-1 a CHO dhfr^r DUX B11. Bunková línia CHO DUX B11 bola získaná do firmy Biogen Inc. a pôvodne bola získaná Dr. Lawrencom Chaisinom (Columbia University).

Pre transfekciu buniek COS-1 bolo 5 mg každého nerozštiepeného plazmidu TM29 (TM29-4: pTCSLHuV_{kapa} 16GC_{kapa} -DHFR a

TM29-26: pTCSLHuV_H16GC_{kapá}1NeoApa[·]) precipitovaných v etanole a resuspendovaných vo vode na koncentráciu 1 mg/ml. Plazmidy boli pomocou elektroporácie kotransfekované do $3,8 \times 10^6$ buniek použitím zariadenia BioRad Gene Pulser pri 250 V a 960 mFD. Transfekované bunky boli resuspendované v Dubelccom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) a potom kultivované 3 dni. Kontrolné vektorové plazmidy (pTCSLDHFRapa[·] a pTCSLNeoApa[·]) boli pripravené a kotransfekované podobne ako plazmidy TM29. Potom boli transfekované bunky resuspendované a kultivované podobne ako bunky COS transfekované TM29.

Pre transfekciu buniek CHO DUX bolo 5 mg každého plazmidu TM29 (pozri vyššie) linearizovaných vždy štepením reštrikčnými enzýmami AatII. Lineárne fragmenty boli vyžrážané v etanole a resuspendované vo vode na koncentráciu 1 mg/ml. Potom boli plazmidy pomocou elektroporácie kotransfekované do 5×10^6 buniek podobným spôsobom, ako to bolo uvedené vyššie. Transfekované bunky boli resuspendované v alfa minimálnom esenciálnom médiu (alfaMEM) doplnenom tymidínom, adenozínom a deoxyadenozínom (neselektívne médium) a 3 dni kultivované. Kontrolné vektorové plazmidy (pozri vyššie) boli pripravené a kotransfekované podobne ako plazmidy TM29. Potom boli transfekované bunky resuspendované a kultivované podobne ako bunky COS transfekované TM29.

Analýza supernatantov TM29 transfektantov COS humánnou IgG_{1kapá}
ELISA

Po 3 dňoch kultivácie sa zdali byť bunky COS transfekované TM29 konfluentné. Preto bol supernatant odobraný a bunky boli zahodené. Produkcia humánneho IgG bunkami bola stanovaná na supernatante kultúry použitím testu ELISA s humánnym IgG_{1kapá}. Supernatant IgG bol zachytený myšacou antihumánnou IgG₁ Fc protilátkou, ktorou bola potiahnutá 96-jamková miska. Detekcia bola uskutočňovaná konjugátom chrenovej peroxidázy s kozou antihumánnou Ig_{kapá} protilátkou a farba bola vyvinutá o-fenyléndiamínom (OPD). Koncentrácia IgG v supernatante boli stanovené porovnaním merania optickej denzity s krivkou

zostrojenou použitím purifikovanej humánnej IgG_κ protilátky so známou koncentráciou. Supernatant buniek COS transfekovaných TM29 poskytol koncentráciu humánneho IgG 201,3 ng/ml. Supernatant z buniek COS transfekovaných kontrolnou DNA poskytol koncentráciu humánneho IgG 0 ng/ml.

Selekcia buniek CHO transfekovaných TM29

Po 3 dňoch kultivácie sa zdali byť bunky CHO transfekované TM29 konfluentné. Preto bol k bunkám pridaný 0,25% trypsín (v Hankovom vyváženom solnom roztoku), aby došlo k ich oddeleniu od kultivačných baniek. Bunky boli zhromaždené, odstredené a bol oddelený supernatant. Bunková peleta bola resuspendovaná v selekčnom médiu alfaMEM na koncentráciu 2×10^5 buniek/ml a suspenzia bola prenesená do 24-jamkovej misky v množstvo 1 ml/jamka. Selekčné médium alfaMEM vykazovalo dvojitú selekčnú schopnosť. Nemalo prídavky nukleotidov, nahradzovalo FBS dialyzovaným FBS (selekcia na DHFR⁺ v pTCSLHuV_κ16GC_κDHFR a pridávalo Geneticin (g-418) (selekcia na neo^r v pTCSLHuV_H16-GC_κ1NeoApa).

Analýza supernatantu buniek CHO transformovaných TM29 skúškou ELISA (IgG_κ) a prietokovou cytometriou

Po 14 dňoch v selekčnom médiu bol z každej jamky odobraný supernatant buniek CHO transfekovaných TM29 a skúšaný použitím ELISA (IgG_κ). Koncentrácia humánneho IgG v supernatantoch buniek CHO transfekovaných TM29 ležala v rozmedzí od 144,6 do 291,9 ng/ml, pričom priemerná koncentrácia bola 240,5 ng/ml. Koncentrácia humánneho IgG v supernatantoch buniek CHO transfekovaných kontrolnou DNA bola 0 ng/ml.

Supernatanty z troch jamiek s bunkami CHO transfekovanými TM29, ktoré boli najväčšími producentmi (2C3, 2C4, 2B6) a z jednej jamky s bunkami CHO transfekovanými kontrolnou DNA boli tiež podrobené prietokovej cytometrii. Tri vzorky TM29 (2C3, 2C4 a 2B6) farbili Jukartove bunky pozitívne (stredná kanáliková

fluorescencia ležala v rozmedzí od 186,61 do 290,01) a nefarbili pozitívne bunky HPB (stredná kanáliková fluorescencia ležala v rozmedzí od 11,77 do 13,82). Kontrolná vzorka, 3D4 nefarbila pozitívne Jukartove bunky (stredná kanáliková fluorescencia 11,96).

Klonovanie buniek CHO transfekovaných TM29 metódou limitného riedenia

Tri jamky obsahujúce bunky CHO transfekované TM29, ktoré boli najväčšími producentmi (2C3, 291,9 ng/ml; 2C4, 289,7 ng/ml; 2B6, 289,5 ng/ml) boli zvolené pre klonovanie metódou limitného riedenia. V prípade každej jamky bola koncentrácia buniek zriedená selekčným médiom alfaMEM a získané zriedené suspenzie s koncentráciou 2 bunky/jamka, 1 bunka/jamka a 0,5 bunky/jamka boli nanesené na 96-jamkové misky. 10 dní po klonovaní bol rast kolónií pozorovaný v množstve jamiek v každej z misiek, kde bola použitá koncentrácia 0,5 bunka/jamka pre vzorky 2C3, 2C4 a 2B6. Preto boli supernatanty zo všetkých jamiek zo všetkých misiek s koncentráciou 0,5 bunky/jamka spojené a podrobené skúške ELISA ($\text{IgG}_{1\text{kapa}}$). Všetky jamky, ktoré vykazovali rast buniek boli pri skúške ELISA pozitívne. Celkovo 24 jamiek s najväčšími producentmi (10 jamiek z 2C3 a 14 jamiek z 2B6) bolo zvolených pre expanziu do 24-jamkovej misky a tieto bunky boli pestované až do konfluencie. Z každej z jamiek bol odobraný supernatant a ten bol podrobený skúške ELISA ($\text{IgG}_{1\text{kapa}}$). Koncentrácia humánneho IgG ležala v rozmedzí od 0,7 mg/ml do 4,8 mg/ml, pričom priemerná koncentrácia bola 2,9 mg/ml. Supernatanty zo 6 jamiek s klonmi CHO transfekovanými TM29, ktoré boli najväčšími producentmi, boli skúšané prietokovou cytometriou.

Tri jamky obsahujúce najväčšie producenty boli zvolené pre nanášanie na 96-jamkové misky použitím limitného riedenia: bunky č. 1B1 (233,6 ng/ml), 1D6 (233,3 ng/ml), 2B2 (235,5 ng/ml) a 2C1 (236,0 ng/ml). Pre každú jamku boli použité tri misky so selektívnym médiom: 1 pri koncentrácii 1 bunka/jamka a 2 pri koncentrácii 0,5 bunky/jamka. Všetkých 6 vzoriek farbilo

Jurkatove bunky pozitívne (stredná kanáliková fluorescencia v rozmedzí od 313,68 do 356,87) a nefarbilo pozitívne bunky HPB (stredná kanáliková fluorescencia v rozmedzí od 7,59 do 8,16). Všetkých 6 vzoriek bolo expandovaných do 25 cm² banky, zmrazených a uložených pod kvapalným dusíkom. Pre subklonovanie boli zvolené tri jamky s najväčšími producentmi (2C3-1G2, 2C3-2H10 a 2C3-2H2a).

Jedná jamka s bunkami CHO transfekovanými kontrolnou DNA (3D4) bola použitá na klonovanie pomocou metódy limitného zriedenia, podobne ako to bolo uskutočnené s jamkami s TM29. Pri zriedení buniek na koncentráciu 10 x nižšiu, ako je koncentrácia požadovaná, nebol 10 dní po klonovaní pozorovaný žiadny rast kolónií. Preto bola zo zmrazenej banky s 3D4 vytvorená čerstvá kultúra. Klonovanie pomocou metódy limitného zriedenia bolo opakované použitím tejto novej kultúry. Po 16 dňoch od klonovania bolo 6 z najviac konfluentných jamiek z misky s koncentráciou 0,5 bunky/jamka (1B5, 1C11, 1D6, 2E7, 2F3 a 2F9) zvolených pre expanziu do 24-jamky. Každá jamka bola potom expandovaná do 25cm² a potom do 75cm² banky, pričom v raste bolo pokračované až do konfluencie. Supernatant z každej banky bol odobraný a skúšaný pomocou IgG_{1kapa} ELISA. Koncentrácia humánneho IgG bola 0 ng/ml. Každá banka bola potom zmrazená a uložená pod kvapalným dusíkom.

Expanzia kultúr neklonovaných buniek CHO transfekovaných TM29 do mierky prevaľovaných fliaš

Tri jamky obsahujúce bunky CHO transfekované TM29, ktoré boli najväčšími producentmi (2C3, 291,9 ng/ml; 2C4, 289,7 ng/ml; 2B6, 289,5 ng/ml) boli tiež zvolené pre expanziu do 25cm² baniek, ako neklonované kultúry. Tentoraz bola jedna nádobka s každou z kultúr TM29 (rovnako tak ako jedna nádobka s kultúrou buniek CHO transfekovaná kontrolnou DNA) zmrazená a uložená pod kvapalný dusík. Každá neklonovaná kultúra bola expandovaná do 75cm² banky. Z jednej 75cm² banky z každej kultúry bola kultúra expandovaná do troch 75cm² baniek, pričom sa koncentrácia séra v alfaMEM médiu znižovala z 10 na 5 %. Každá z 75cm² baniek, ako v prípade

2C3, tak aj v prípade 2B6, bola expandovaná do 2-litrovej prevaľovanej fľaše. Všetky tri 75cm² banky pre 2C4 boli zmrazené a uskladnené pod kvapalným dusíkom. Keď už boli kultúry v prevaľovaných fľašiach, bola koncentrácia séra v médiu alfaMEM opäť znížená z 5 % na 1 %. Po 9 dňoch v kultúre vykazovali fľaše 2B6 konfluentný nárast, zatiaľ čo fľaše 2C3 vykazovali len asi 25% konfluenciu. Supernatanty zo všetkých fliaš 2B6 a 2C3 boli odobrané 9, 14 a 16 deň a potom boli bunky zahodené. Zhromaždené supernatanty boli odstredené a uskladnené pri -20 °C. Alikvót každého z troch zozbieraných supernatantov pre 2B6 a 2C3 bol skúšaný použitím testu ELISA (humánný IgG_{1kapa}). Celkové množstvo humánneho IgG v 2B6 bolo 820 mg v 2C3 1923 mg.

Subklonovanie klonov buniek CHO transfekovaných TM29 použitím metódy limitného riedenia

Pre subklonovanie pomocou metódy limitného riedenia boli vybrané tri jamky s klonmi buniek CHO transfekovanými TM29 (2C3-1G2, 4,8 mg/ml; 2C3-2H2A, 4,1 mg/ml; 2C3-2G10, 4,0 mg/ml). 14 dní po subklonovaní bol pozorovaný nárast kolónií v množstve jamiek každej z misiek, kde bola použitá koncentrácia 0,5 bunka/jamka pre vzorky 1G2, 2G10 a 2H2a. Preto boli supernatanty z jamiek, v ktorých došlo k rastu kolónií spojené a podrobené testu ELISA (humánný IgG_{1kapa}). Všetky jamky, ktoré vykazovali rast buniek boli pri skúške ELISA pozitívne, takže účinnosť klonovania bola 100 %. Celkovo 24 jamiek s najväčšími producentmi (2 jamky z 2H2a, 5 jamiek z 2G10, 17 jamiek z 1G2) bolo zvolených pre expanziu do 24-jamkovej misky a tieto bunky boli pestované až do konfluencie. Z každej z jamiek bol odobraný supernatant a ten bol podrobený testu ELISA (humánný IgG_{1kapa}). Koncentrácia humánneho IgG ležala v rozmedzí od 1,2 mg/ml do 9,2 mg/ml, pričom priemerná koncentrácia bola 4,2 mg/ml. Supernatanty zo 4 jamiek so subklonmi CHO transfekovanými TM29, ktoré boli najväčšími producentmi (2G5, 2H11, 1H6, 2E9), boli skúšané prietokovou cytometriou. Všetky 4 vzorky farbili Jukartove bunky pozitívne (stredná kanáliková fluorescencia v rozmedzí od 211,51 do 292,45) a nefarbili pozitívne bunky HPB (stredná kanáliková

fluorescencia v rozmedzí od 8,67 do 10,25).

Príprava zásobných zmrazených buniek, klonov buniek CHO transfekovaného TM29

Ako klon buniek CHO transfekovaných TM29 pre prípravu zásobných zmrazených buniek bol zvolený klon 2C3-1G2-1H6-2F5. Tento klon expandovaný z jednej 75cm² banky do piatich 225cm² baniek, aby sa získal dostatočný počet buniek, ktorý by slúžil ako zásoba zmrazených buniek pre ciele tohto výskumu. Zásoba zmrazených buniek bola pripravená podľa SOP TMB1-001.00. Bunky boli ošetrované trypsínom, odobrané z každej z baniek a spojené. Spojená bunková suspenzia obsahovala $3,2 \times 10^8$ buniek s životaschopnosťou 99 %. Bolo pripravených 72 nádobiek, z ktorých každá obsahovala 2×10^6 buniek v 1ml objeme. Všetky fľaštičky s týmto klonom boli označené skratkou TM29-646-132.

P r í k l a d 7

Porovnanie sekvencií CDR-štepových protilátok TM29 s inými oblasťami základnej štruktúry

TM29 VK

```

1   DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVNYIYWYQQTPGKAPKLLIYYT 50
REI  -----Q-----QDIKYLN-----EA
16G8 ENVL-----AIM-----L-EK-MS-----KSDAS-----W-----
HIC  E-VL-----GT-----L-P-ERA-LS-----Q-----S-SYLA-----K-Q-R-----GA

51  SNLAPGVPSRFGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQQFTSSPFTFGQG 100
REI  -----QA-----YQ-L-Y-----
16G8 -----T-----NS-SL-----MEG-A-----S-----
HIC  -SR-T-I-D-----F-L-R-E-_-F-V-----YG-----W-----

101 TKLQIT      106
REI  -----
16G8 -----E-K
HIC  -----VE-K

```

TM29 VH

```

1   EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAY 50
KOL  Q-----I-SYA-Y-----I
16G8 D-----L-G-RK-AA-----D-----
WEA  Q-D-L-E-G-A-AND-N-----LSF

51  ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARRG 100
KOL  -WDDG-DQH-SV-----D-
16G8 -----P-----T-S-AM-Y-----
WEA  -GGSG-----SV-----NB-S-Y-S-A-A-YY-----

101  EGAM          DYWGQGTPVTVSS
KOL  GHGFCSSASCFGP-----
16G8 -----S-----
WEA  WLL          N-----L-----

```

TM29 so sekvenciami prvej verzie
 TM29.1 s SS na AA (23-24) zmenami
 TM29.2 s S na P (75) zmenou
 TM29.3 s GV/F na AM/Y (92-93/95) zmenami

P r í k l a d 8

Scatchardova analýza TM29 mAb

Scatchardove analýzy protilátok TM29 a 16G8 boli uskutočnené v troch nezávislých experimentoch. V ďalej uvedenej tabuľke sú zahrnuté hodnoty K_d stanovené pri každom z týchto experimentov.

Príklad	TM29 K_d (M)	16G8 K_d (M)
1	$1,45 \times 10^{-9}$	$2,86 \times 10^{-9}$
2	$1,65 \times 10^{-9}$	$2,65 \times 10^{-9}$
3	$1,15 \times 10^{-9}$	$2,44 \times 10^{-9}$
Stred	$1,42 \times 10^{-9}$	$2,65 \times 10^{-9}$

P r í k l a d 9

Prehľad práce na chimerickej TM29

Chimeriká v bunkách COS a CHO

* cDNA oblasti V(D)J boli klonované do expresných vektorov buniek CHO, pTCSLNeo (H) a pTCSLDHFR (k) v cDNA konfigurácii.

* Expresné plazmidy boli kotransfekované do buniek COS a CHO.

* Koncentrácia Ab v supernatante buniek COS bola asi 35 ng/ml.

* Transfektanty buniek CHO boli analyzované (FACS a ELISA), raz klonované a amplifikované s MTX (20nM, 100nM a 500nM).

* Koncentrácia protilátky z neamplifikovaného klonu buniek CHO bola asi 3 mikrogramy/ml; Jukartove bunky boli farbené pozitívne. Neamplifikované klony boli zmrazené v kvapalnom dusíku.

P r í k l a d 10

Expresia chimerickej 16G8 v bunkách COS a CHO

Chimerická 16G8

Konštrukty ľahkého a ťažkého reťazca obsahovali úplnú myšaciu oblasť V s humánnou konštantnou oblasťou v rovnakých expresných vektoroch použitých pre CDR-štepene konštrukty: pTCSLDHFR väzba pTCSNeo väzba - konštrukty vykazovali dvojitú selekčnú schopnosť.

Transfektanty buniek COS - asi 35 ng/ml.

Transfektanty buniek CHO - 16 pozitívnych jamiek/54 jamiek.

	ng/ml		korekcia na objem
1A1	151,6		
1A6	166,6		
1B3	107,2		
1B6	179,6		
1D2	101,0		
1D5	215,1	*	2,2 µg/ml
2A4	199,8		
2B1	184,5		
2B2	213,8	*	2,1 µg/ml
2B4	130,6		
2C2	119,6		
2C6	214,4	*	2,1 µg/ml
2D3	216,6	*	2,2 µg/ml
2D6	139,7		
3A1	198,7		
3A2	172,2		

všetky expandované do 25cm² baniek.

* Uskutočnená prietoková cytometria.

P r í k l a d 1 1

Prehľad práce na TM29

TM29

TM29 v COS/CHO

* Bola pripravená cDNA z CDR-štepéných oblastí V v produkčnej línii NSO, amplifikovaná pomocou PCR a sekvenovaná.

* Fragменты DNA boli klonované do pTCSLNeo (H) a pTCSLDHFR

(k) v cDNA konfigurácii.

* Plazmidy boli kotransfekované do COS a CHO.

* Supernatant z buniek COS obsahoval asi 2 mikrogramy/ml Ab.

* Transfektanty buniek CHO vylučovali asi 3 mikrogramy/ml Ab pred klonovaním a amplifikáciou, supernatant farbilo Jukartove bunky pozitívne. Po trojnásobnom klonovaní bola z najlepšieho neamplifikovaného producenta Ab vytvorená zásoba buniek.

* Línie buniek CHO boli amplifikované pri rôznej koncentrácii MTX.

P r í k l a d 1 2

Porovnanie TM27L, TM27I a TM23 pri kompetitívnej
skúške 4H11-FITC

Experiment 1:

smernice TM23
----- = 1,56
smernice TM27L
smernice TM23
----- = 2,04
smernice TM27I

Experiment 2:

smernice TM23
----- = 1,82
smernice TM27L
smernice TM23
----- = 2,44
smernice TM27I

V porovnaní s TM23 boli hodnoty ako pre TM27L, tak aj pre

TM27I menej ako trojnásobné.

P r í k l a d 1 3

TM27 metotrexátová amplifikácia

Produktivita (mikrogram/10⁶ buniek/deň)

Koncentrácia metotrexátu (nM)

		0	20	100	10-200	20-200
C7	*7/30	27	nd	nd	nd	265,8
	*7/22	3,5	nd	19,2	14,7	34,2
	7/6	2,6	nd	nd	9,1	nd
	6/25	2	4,8	4,5	nd	nd
	6/18	3	8,9	nd	nd	nd
H9	*7/30	22,7	nd	nd	nd	181,9
	*7/22	3,9	nd	9,4	11,6	34,4
	6/25	1,5	1,8	4,7	3,6	nd
	6/18	1,8	1,5	nd	nd	nd

* neposkytuje porovnanie medzi stanoveniami
nd = namerané

Relatívna hodnota v rámci jedného stanovenia

		0	20	100	20-100	20-200
C7	*7/30	1	nd	nd	nd	9,8
	*7/22	1	nd	5,5	4,2	9,8
	7/6	1	nd	nd	3,5	nd
	6/25	1	2,4	2,3	nd	nd
	6/18	1	3,0	nd	nd	nd
H9	*7/30	1	nd	nd	nd	8,0
	*7/22	1	nd	2,4	3,0	8,8
	6/25	1	1,2	3,1	2,4	nd
	6/18	1	0,8	nd	nd	nd

Status

	0	20	100	20-100	20-200
C7 8/11	fm	fm,s,sf4	fm	fm	fm,s*
H9 8/11	fm	zahozeno	fm,s,f2	fm	fm,s*

Kľúč

fm = jedna skúmavka so zmesovou kultúrou bola zmrazená

s = subkultúra pri jednom limitnom zriedení

s* = prvé limitné riedenie prebiehalo

f# = jedna fľaštička z každého počtu # jamiek bola zmrazená

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín majúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá zahŕňa všetky oblasti CDR alebo časť oblastí CDR v podstate odvodených z monoklonálnej protilátky, s výkazom špecificity voči vybranej subpopulácii T-buniek exprimujúcich variabilnú oblasť beta reťazca receptora antigénu T-bunky Vbeta5.2 alebo Vbeta5.3, v spojení s vybranými zvyškami variabilnej základnej štruktúry takisto odvodenými z tejto monoklonálnej protilátky, pričom táto humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín je schopná sa viazať k vybraným subpopuláciám T-buniek s väzbovou afinitou, ktorá je prinajmenšom porovnateľná s väzbovou afinitou, ktorú vykazuje monoklonálna protilátka a pričom táto humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín obsahuje aminokyselinovú sekvenciu TM27 V_k

I DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCASQGISNYLNWYQQTPGKAPKLLIYY 50

51 TSSLHSGVPSRFRSGSGGTDYFTISLQPEDLATYYCQQYSKLPRTFGQ 100

101 GTKLQIT 107,

a ďalej obsahuje aminokyselinovú sekvenciu zvolenú zo súboru zahrnujúceho aminokyselinovú sekvenciu TM27 V_H

I QVQLQESGPGGLVSRPSQTLSTCTVSGFSLTAYGVNWVRQPPGRGLEWLG 50

51 IWGDGNTDYN SALKSRVTMLKDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV 100

101 TATLYAMDYWGQGS LVTVSS 120,

sekvenciu TM27 V_H, kde aminokyselinový zvyšok 48 je nahradený izoleucínom (I),

sekvenciu TM27 V_H, kde aminokyselinové zvyšky 78 a 79 sú valín (V)

a fenylalanín (F),
 sekvenciu TM27 VH, kde aminokyselinové zvyšky 67 až 70 majúce
 sekvenciu VTML sú nahradené sekvenciou LSIS a aminokyselinový
 zvyšok 73 je asparagín (N) a
 sekvenciu TM27 VH, kde aminokyselinový zvyšok 92 je arginín (R).

2. Humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín majúci
 aminokyselinovú sekvenciu, ktorá zahŕňa všetky oblasti CDR
 alebo časť oblastí CDR v podstate odvodených z monoklonálnej
 protilátky, s výkazom špecificity voči vybranej subpopulácii
 T-buniek exprimujúcich variabilnú oblasť beta reťazca receptora
 antigénu T-bunky Vbeta8.1, v spojení s vybranými zvyškami
 variabilnej základnej štruktúry takisto odvodenými z tejto
 monoklonálnej protilátky, pričom táto humanizovaná protilátka
 alebo jej väzbový proteín je schopná sa viazať k vybraným
 subpopuláciám T-buniek s väzbovou afinitou, ktorá je prinajmenšom
 porovnateľná s väzbovou afinitou, ktorú vykazuje monoklonálna
 protilátka a pričom táto humanizovaná protilátka alebo jej
 väzbový proteín obsahuje aminokyselinovú sekvenciu TM29 V_k

1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVNYTYWYQQTPGKAPKLLIYYT 50

51 SNLAPGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDLATYYCQQFTSSPFTFGQG 100

101 TKLQIT 106,

a ďalej obsahuje aminokyselinovú sekvenciu zvolenú zo súboru
 zahrnujúceho aminokyselinovú sekvenciu TM29 V_H

1 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAY 50

51 ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARRG 100

101 EGAMDYWGQGTPTVSS 117,

sekvenciu TM29 V_H, kde aminokyselinové zvyšky 23 a 24 sú obidva
 nahradené alanínovými (A) zvyškami,

sekvenciu TM29 VH, kde aminokyselinový zvyšok 75 je nahradený prolínom (P) a

sekvenciu TM29 VH, kde aminokyselinové zvyšky 92 a 93 sú nahradené alanínom (A) a metionínom (M) a aminokyselinový zvyšok 95 je nahradený tyrozínom (Y).

3. Humanizovaná protilátka podľa nároku 1 alebo 2 vykazujúca izotyp IgG2a.

4. Humanizovaná protilátka podľa nároku 3, v ktorej jeden alebo viac zvyškov v konštantných doménach Ig bolo zmenených s cieľom zmeny efektorovej funkcie tejto konštantnej domény.

5. Humanizovaná protilátka alebo jej väzbová časť podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 produkovaná pomocou rekombinantnej DNA technológie.

6. Spôsob výroby humanizovanej protilátky alebo jej väzbového proteínu podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2, v y z - n a č u j ú c i s a t ý m, že sa

a) izoluje prvá sekvencia DNA kódujúca aspoň jednu oblasť CDR v podstate odvodenú z anti-Vbeta5.2/Vbeta5.3 alebo anti-Vbeta8.1 myšacej monoklonálnej protilátky majúcej špecificitu pre vybranú subpopuláciu T-buniek,

b) táto prvá sekvencia DNA sa klonuje do vhodného vektora,

c) pomocou mutagenézy sa zavedú aminokyseliny vybranej humánnej základnej štruktúry, pričom vznikne CDR štepený konštrukt,

d) hostiteľská bunka sa transformuje konštruktom zo stupňa c) a

e) takto transformovaná hostiteľská bunka sa kultivuje s cieľom produkcie humanizovanej protilátky alebo jej väzbového

proteínu.

7. Spôsob podľa nároku 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že hostiteľská bunka je bunka CHO.

8. Humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 na použitie ako liečivo.

9. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje humanizovanú protilátku alebo jej väzbový proteín podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 v kombinácii s farmaceuticky vhodným excipientom.

10. Humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 na použitie ako liečivo Crohnovej choroby.

11. Humanizovaná protilátka alebo jej väzbový proteín podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 na použitie ako liečivo roztrúsenej sklerózy.

12. Použitie humanizovanej protilátky alebo jej väzbového proteínu podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 pri výrobe liečiva na liečenie Crohnovej choroby.

13. Použitie humanizovanej protilátky alebo jej väzbového proteínu podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2 pri výrobe liečiva na liečenie roztrúsenej sklerózy.

Obr. 1

10 20 30 40 50
* * * * *

TM23 VL DIQMTQTSSLSASLGLDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY
TM27 VL DIQMTQSPSSLSASVGLDRVTITCSASQGISNYLNWYQQTPGKAPKLLIYY

CDRI

60 70 80 90 100
* * * * *

TSSLHSGVPSRFSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYQCQYKLPRTFFG
TSSLHSGVPSRFSGSGTDYFTTISLQPEDIAATYQCQYKLPRTFFGQ

CDR2

CDR3

107

*

GTKVEIK
GTKLQIT

10 20 30 40 50
* * * * *

TM23 VH QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTAYGVNWRQPPGKLEWLGM
TM27L VH QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLTAYGVNWRQPPGKLEWLGM
TM27I VH =====AYGVN=====I=M
TM27.1VH =====AYGVN=====L=M
TM27.2VH =====AYGVN=====L=M
TM27.3VH =====AYGVN=====L=M

CDRI

Obr. 1 (pokračovanie)

60	*	70	*	80	*	90	*	100	*
IWGDGNTDYN	SALK	SI SKD	NSKSQ	FLKM	NSLQ	TD	DDT	ARY	YCAR
IWGDGNTDYN	SALK	SRV	TMLK	DT	SKNQ	F	SLRL	SSV	TAA
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
IWGDGNTDYN	SALK	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====

CDR2

110	*	120	*
TATLYAMDY	WGQG	TS	VT
TATLYAMDY	WGQG	SL	VT
TATLYAMDY	=====	=====	=====
TATLYAMDY	=====	=====	=====
TATLYAMDY	=====	=====	=====
TATLYAMDY	=====	=====	=====

CDR3

16G8 V_L ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSVNYIYWYQQKSDASPKLWIYYT
 TM29 V_L DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVNYIYWYQQTPGKAPKLLIYYT

CDRI

60 70 80 90 100
 * * * * *
 SNLAPGVPTRFSGSGGNSYSLTISSMEGEDAATYICQQFTSSPFTFGSG
 SNLAPGVPSRFSGSGGTDYTFITSSLPEDIATYICQQFTSSPFTFGQG

CDR3

CDR2

Obr. 2

106
*

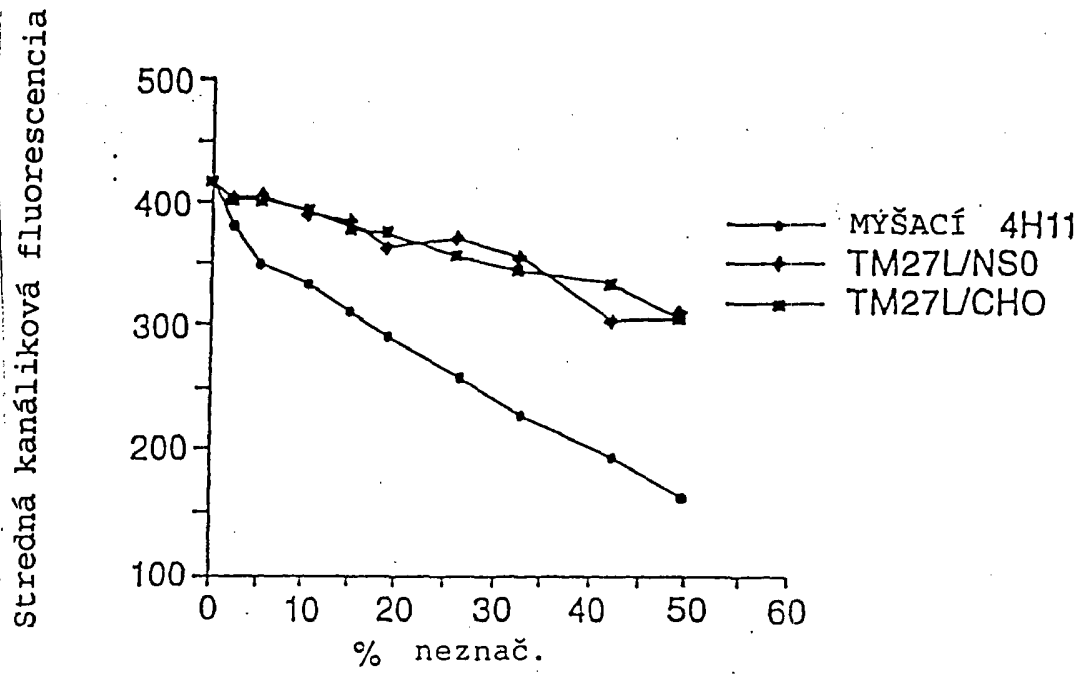
TKLEIK
TKLQIT

16G8 V_H DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPDKGLEWVAY
 TM29 V_H EVQLVESGGGVQPGRSRLRSLSCSSGFTFSNFGMHWVRQAPDKGLEWVAY
 TM29.1 V_H =====AA=====NFGMH=====Y
 TM29.2 V_H =====NFGMH=====Y
 TM29.3 V_H =====NFGMH=====Y

CDRI



Obr. 3

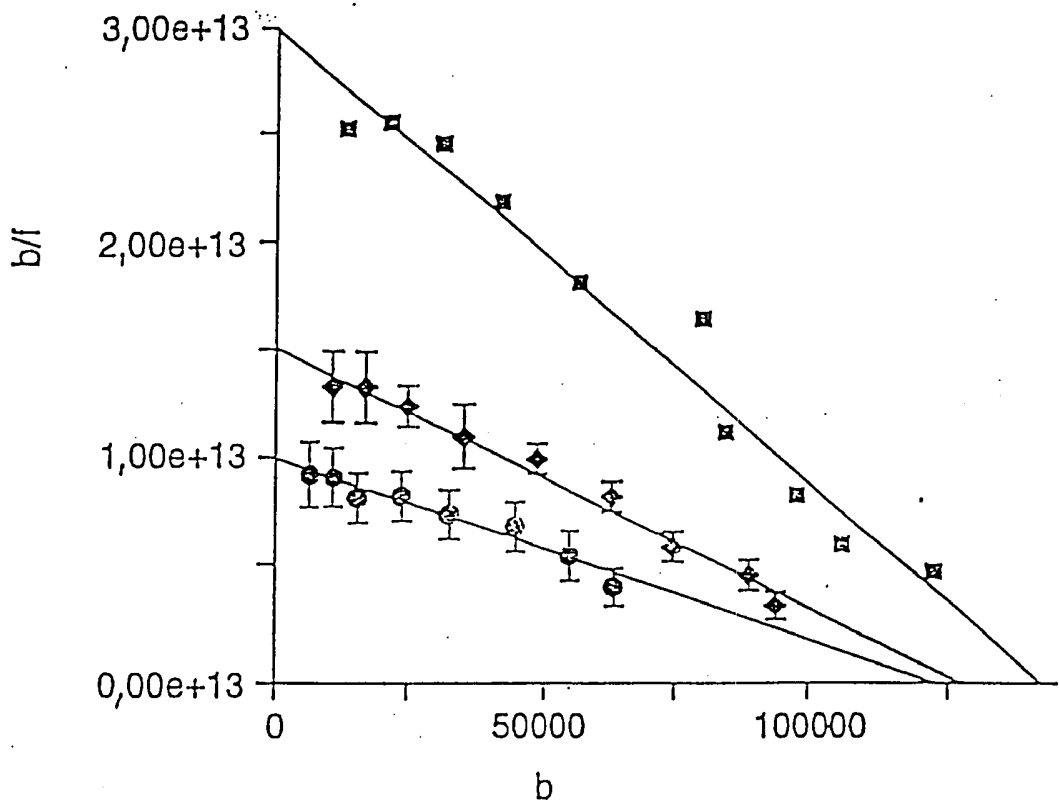


MYŠACÍ 4H11 $y = 393,85 - 5,0535x$ $R^2 = 0,985$
 TM27L/NS0 $y = 415,77 - 2,3218x$ $R^2 = 0,939$
 TM27L/CHO $y = 415,64 - 2,1880x$ $R^2 = 0,987$

UG/ML	% NEZNAČEN.	MYŠACÍ 4H11	TM27L/NS0	TM27L/CHO
5,000	50,000	149,687	303,633	299,073
3,750	42,900	181,330	296,867	328,207
2,500	33,300	219,803	349,850	342,667
1,875	27,300	251,783	367,640	358,120
1,250	20,000	288,993	360,657	374,003
0,938	15,800	308,113	380,870	378,773
0,625	11,100	333,177	388,950	395,623
0,312	5,900	349,383	405,483	401,297
0,156	3,030	380,860	400,113	402,853
0,000	0,000	417,797	417,797	417,792

Obr. 4

TM27 Scatchardova analýza - HPB bunky



		Kd (nM)
⊙	TM27 CHO	12,3
◆	TM27 NS0	8,2
⊠	4H11	4,5