



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **96-00509**

(22) Data de depozit: **11.03.1996**

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
29.06.2001 BOPI nr. **6/2001**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 5041381, J. immunological Methods
117, 1989

(71) Solicitant: **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION, PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, US;**
SMITHKLINE BEECHAM PLC, BRENTFORD, GB;

(73) Titular: **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION, PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, US;**
SMITHKLINE BEECHAM PLC, BRENTFORD, GB;

(72) Inventatori: **HOLMES DUDLEY STEPHEN, EPSOM, GB; GROSS MITCHELL STUART, WAYNE, US;**
SYLVESTER DANIEL R., PHOENIXVILLE, US;

(74) Mandatar: **S.C. ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI**

(54) **ANTICORP RECOMBINANT, MONOCLONAL, COMPOZIȚIE
FARMACEUTICĂ ȘI METODĂ DE TRATAMENT CU ACEASTA**

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la un anticorp recombinant, monoclonal, în care regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde, în ordine, prima regiune determinantă a complementarității având secvența de aminoacizi prezentată în SECV NR.22, a doua regiune determinantă a complementarității având secvența de aminoacizi prezentată în SECV NR.24, a treia regiune determinantă a complementarității având secvența de aminoacizi prezentată în SECV NR.26, iar regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde, în

ordine, prima regiune determinantă a complementarității având secvența de aminoacizi prezentată în SECV NR.16, a doua regiune determinantă a complementarității având secvența de aminoacizi prezentată în SECV NR.18, a treia regiune determinantă a complementarității având secvența de aminoacizi prezentată și SECV NR.20, la o compoziție farmaceutică cu acesta, și la o metodă de tratare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces a IgE la un om, folosind compoziția farmaceutică.

Revendicări: 18
Figuri: 11

RO 116809 B1



Invenția se referă la un anticorp recombinant monoclonal, la o compoziție farmaceutică cu acesta și la o metodă de tratare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces a IgE la un om utilizată în tratamentul și diagnosticarea condițiilor mediate de IL4.

5 Este cunoscut din **US 5041381** un anticorp monoclonal având specificitate de legare a interleukinei 4 umane.

Este, de asemenea, cunoscut că bolile alergice sunt relativ minore, cum ar fi, rinita și conjunctivita sezonieră, mai serioase, cum ar fi, astmul și dermatita atopică și periculoase pentru viață ca șocul anafilactic. Legat de aceste condiții este răspunsul imun al corpului la alergeni, răspuns care implică producerea anticorpilor de imunoglobulină E (IgE) la indivizi predispuși genetic (atopi). Inhibarea producerii IgE a fost un țel îndelungat în imunoterapia bolii alergice prin folosirea vaccinurilor de desensibilizare. Totuși, în anii din urmă, siguranța și eficacitatea terapiei prin vaccinare a fost pusă sub semnul întrebării, dar dorința de a reduce nivelurile IgE nu a cunoscut o scădere.

Interleukina 4 (IL4) este o proteină mediatore din sistemul limfoid. Studiile limfocitelor de la indivizi atopici au arătat prezența unui număr mai mare de limfocite T capabile să secrete IL4 ca răspuns al stimulării și cantități mai mari de IL4 secretate după simulare.

20 Anticorpul anti-IL4 s-a dovedit că inhibă IgE, dar nu și IgG sau IgG_{2a} (Finkelman și colab., Ann.Rev.Immunol., 8:303 (1990)) și producerea de IL5 secretată de celulele T (Magg și colab., J.Immunol. 148:2142(1992)). În plus, date recente sugerează că IL4 poate afecta acumularea eozinofilelor în țesuturi. Vezi, de exemplu, Tepper și colab., Cell, 62:457 (1990); Tepper și colab., Cell, 57:503(1989).

25 Rămâne ca o necesitate în domeniu, producerea unui antagonist IL4 de înaltă afinitate, care ar reduce inflamația eozinofilică, atât prin reducerea proliferării care secretă IL5, cât și prin inhibarea unui mecanism prin care eozinofilele se pot acumula în țesuturi și pot fi folosite pentru tratarea, prevenirea sau diagnosticul reacțiilor alergice.

30 Problema pe care o rezolvă invenția este de a obține un anticorp monoclonal recombinant, o compoziție farmaceutică și punerea la punct a unei metode de tratare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces IgE la un om.

Anticorpul monoclonal recombinant, conform invenției, este constituit din regiunea variabilă a lanțului greu care cuprinde în ordine, prima regiune determinantă a complementarității având secvența Thr Ser Gly Met Gly Val Ser (SECV NR. 22), a doua regiune determinantă a complementarității având secvența His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser (SECV NR. 24), a treia regiune determinantă a complementarității având secvența Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val (SECV NR. 26); iar regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde, în ordine, prima regiune determinantă a complementarității având secvența Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn (SECV NR. 16), a doua regiune determinantă a complementarității având secvența Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser (SECV NR. 18), a treia regiune determinantă a complementarității având secvența Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr (SECV NR. 20).

45 Compoziția farmaceutică, conform invenției, conține 0,5...20%, în greutate, anticorp monoclonal definit în revendicarea 1 și un purtător acceptabil farmaceutic.

RO 116809 B1

Metoda de tratare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces a IgE la un om, conform invenției, constă în aceea că se administrează o compoziție farmaceutică definită în revendicarea 15, astfel, încât cantitatea de anticorp recombinant monoclonal definit în revendicarea 1, să fie cuprinsă, în intervalul 0,1...20 mg/70 kg corp, parenteral, de preferință, intramuscular, la un interval de timp cuprins, între 2 zile până la 3 săptămâni. 50

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- reduce durata tratamentului în cazul tratării condițiilor alergice;
- moleculele purtător determină creșterea timpului de înjumătățire al proteinelor de fuziune. 55

Invenția de față furnizează o proteină de fuziune care are afinitate de legare pentru interleukina-4 și care cuprinde regiuni care determină complementaritate (CDR-1) derivată de la un anticorp de neutralizare non-uman (Mab) caracterizat printr-o disociere constantă, egală sau mai mică de $2 \times 10^{-10}M$, pentru IL4 umană și un prim partener de fuziune în care, cel puțin una și, de preferință, toate regiunile care determină complementaritatea (CDR-uri) ale primului partener de fuziune sunt înlocuite prin CDR-uri de la anticorpul monoclonal non-uman (Mab). Anticorpul monoclonal de neutralizare non-uman poate fi ales dintr-un grup care constă din 3B9 și 6A1, așa cum este descris mai pe larg în descrierea detaliată. De preferință, proteina de fuziune este legată funcțional la o a doua proteină de fuziune care cuprinde în totalitate sau parțial un lanț constant de imunoglobulină. 60 65

Invenția furnizează CDR-uri derivate de la anticorpi monoclonali de neutralizare non-umani (Mab) caracterizat printr-o disociere constantă, egală sau mai mică de $2 \times 10^{-10} M$ pentru IL4 umană și molecule de acid nucleic care codifică astfel de CDR-uri. 70

Invenția asigură anticorpi umanizați care au, cel puțin una și, de preferință, șase regiuni care determină complementaritate (CDR-uri) derivate de la anticorpi monoclonali de neutralizare non-umani (Mab) caracterizați printr-o disociere constantă, egală sau mai mică de $2 \times 10^{-10}M$ pentru IL4 umană. 75

Într-un alt aspect, este dat un anticorp himeric care conține regiuni constante ale lanțului greu și ușor uman și regiuni variabile ale lanțului greu și ușor derivate de la anticorpi monoclonali de neutralizare non-umani (MAB) caracterizați printr-o disociere constantă, egală sau mai mică de $2 \times 10^{-10} M$ și pentru IL4 umană.

Invenția asigură, de asemenea, o compoziție farmaceutică care conține una (sau mai multe) dintre proteinele de fuziune sau MAb-uri (de exemplu, umanizați, himerici etc.) și un purtător acceptabil farmaceutic. 80

Invenția asigură o metodă pentru tratarea și/sau prevenirea condițiilor alergice la oameni prin administrarea la numiții oameni ai unei cantități eficiente din compoziția farmaceutică a invenției. 85

Invenția de față furnizează metode și componente utile în producerea proteinelor de fuziune recombinante, MAb-uri (de exemplu, umanizați, himerici, etc.), CDR-uri ale acestora, un Fab (fragment antigen bindidinol) sau $F(ab)_2$ sau analog al acestora care este derivat de la anticorpi monoclonali de neutralizare non-umani (MAB), caracterizați printr-o disociere constantă, egală sau mai mică de $2 \times 10^{-10}M$ pentru IL4 uman. Aceste componente includ secvențe izolate de acid nucleic care recodifică, plasmizi recombinanți care conțin secvențele de acid nucleic sub controlul substanțelor 90

reglatoare selectate capabile să orienteze expresia acestora în celule gazdă și celulele gazdă (de preferință, de la mamifere) transfectate cu plasmidii recombinanți. Metoda de producere implică cultivarea unei linii de celule gazdă transfectate ale prezentei invenții în condiții, astfel, încât se exprimă un anticorp, de preferință, un anticorp umanizat în numitele celule și izolarea produsului exprimat din acestea.

Invenția prezintă și o metodă de diagnosticare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces a imunoglobulinei E la om, care cuprinde contactarea unei probe de fluid biologic cu proteinele de fuziune, MAb-uri (de exemplu, umanizați, himerici, etc.) și Fab-uri ale invenției de față și cercetarea pentru găsirea legării între numita proteină de fuziune, MAb sau Fab și interleukina-4 umană.

Invenția, asigură o metodă pentru căutarea anticorpilor monoclonali care au un titru ridicat pentru interleukina-4 umană care cuprinde: (a) prepararea unei linii celulare hibridomice, caracterizată prin secreția unui anticorp monoclonal față de interleukina-4 umană; și (b) cercetarea numitei linii celulare hibridomice cu interleukină-4 umană cuplată cu aldehidă sau interleukină-4 umană biotinitată. De preferință, linia celulară hibridomică este cercetată cu interleukină-4 umană biotinitată.

De asemenea, este asigurat un MAb de neutralizare care are afinitate ridicată pentru IL4, un fragment Fab sau un fragment $F(ab')_2$ al acestora, produs prin cercetarea unei bănci de produse ale hibridomului cu interleukină-4 umană cuplată aldehidă sau IL4 umană biotinitată.

Invenția de față asigură anticorpi monoclonali de neutralizare de rozătoare, specifici pentru interleukină-4 umană și care au afinitate de legare, caracterizați printr-o disociere constantă, egală cu sau mai mică cu $2 \times 10^{-10}M$. Exemple de astfel de anticorpi monoclonali sunt MAb 3B9 murin și MAb, 6A1 de șobolan și alți MAb-uri având aceleași caracteristici de identificare (cu alte cuvinte, se leagă la același epitop (i) ca 3B9 sau 6A1 cu o specificitate pentru IL4 uman și o disociere constantă, egală sau mai mică decât circa $2 \times 10^{-10}M$). Alt aspect al invenției este hibridomul 3426AIIICIB9.

Invenția furnizează o diversitate de anticorpi, fragmente ale acestora și proteine de fuziune, în special, anticorpi umanizați, care se caracterizează prin specificitate de legare IL4 umană, activitate de neutralizare și afinitate înaltă pentru IL4 umană, așa cum s-a exemplificat cu MAb 3B9 murin sau MAb 6A1 de șobolan. Aceste produse sunt utile în terapie și compoziții farmaceutice pentru tratarea condițiilor alergice mediate IL4 și mediate IgE. Aceste produse sunt, de asemenea, utile în diagnosticarea condiției mediate IL4 prin măsurarea (de exemplu, prin ELISA) a nivelurilor endogene de IL4 aflate în circulație, la oameni.

"Proteina de fuziune" se referă la o proteină codificată printr-o moleculă de fuziune, care poate fi obținută prin expresie într-o celulă gazdă aleasă. Asemenea proteine de fuziune sunt anticorpi obținuți prin inginerie genetică, de exemplu, anticorpi himeri - sau umanizați, sau anticorpi fragmentați cărora le lipsește o parte a regiunii constante de imunoglobulină, de exemplu, F_v , Fab, sau $F(ab)_2$ și alții asemenea.

"Moleculă de fuziune" se referă la o secvență de acid nucleic care codifică regiuni care determină complementaritatea (CDR-uri) față de o imunoglobulină non-umană care este inserată într-un prim partener de fuziune cuprinzând secvențele cadru variabil uman. Opțional, primul partener de fuziune este linkat operațional la un al doilea partener de fuziune.

"Primul partener de fuziune" se referă la o secvență de acid nucleic care codifică un cadru uman sau regiunea variabilă de imunoglobulină în care CDR-urile native (sau întâlnite în mod natural) sunt înlocuite prin CDR-uri ale anticorpului donor. Regiunea variabilă umană poate fi un lanț greu de imunoglobulină, un lanț ușor (sau ambele lanțuri), un analog sau fragmente funcționale ale acestora. Astfel de CDR-uri sau regiuni CDR, localizate în regiunea variabilă a anticorpilor (imunoglobuline) se pot determina prin metode cunoscute în domeniu. De exemplu, Kabat și colab., (Sequences of Proteins of Immunological Interest, Ediția a 4-a., U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Health (1987)), descrie reguli pentru localizarea CDR-urilor. În plus, sunt cunoscute programe de calculator utile pentru identificarea regiunilor/structurilor CDR. 140 145

Termenul "titru ridicat" se referă la un anticorp care are o afinitate de legare caracterizată printr-un K_d egal sau mai mic cu 2×10^{-10} M pentru IL4 umană. 150

Prin "specificitate de legare pentru IL4 umană" se înțelege un titru ridicat (sau afinitate) pentru IL4 umană, nu bovină sau murină.

"Al doilea partener de fuziune" se referă la altă secvență nucleotidică care codifică o proteină sau peptidă la care primul partener de fuziune este fuzionat în cadru prin intermediul unei secvențe linker opționale convenționale (altfel spus, lincată operațional). De preferință ea este o imunoglobulină. Cel de-al doilea partener de fuziune poate să includă o secvență de acid nucleic care același (adică, omolog - prima și a doua proteină de fuziune sunt derivate de la aceeași sursă) sau un anticorp de interes suplimentar (cu alte cuvinte, heterolog). El poate fi un lanț greu sau ușor de imunoglobulină (sau ambele lanțuri ca parte a unei polipeptide unice). Al doilea partener de fuziune nu este limitat la o clasă sau izotip particular de imunoglobulină. În plus, al doilea partener de fuziune poate cuprinde partea regiunii constante a unei imunoglobuline, cum este cea găsită într-un Fab sau $F(ab)_2$ (cu alte cuvinte, o parte distinctă a unei regiuni constante umane, corespunzătoare, sau regiunea cadru). Al doilea partener de fuziune poate cuprinde, de asemenea, o secvență care codifică o proteină membranară expusă la exteriorul suprafeței unei celule gazdă, de exemplu, ca parte a unei bănci fagice prezente sau o secvență care codifică o proteină pentru detecție analitică sau diagnostic, de exemplu, peroxidază de hrean, β -galactozidază, etc. 155 160 165

Termenii Fv, Fc, Fab sau $F(ab)_2$ sunt folosiți cu semnificațiile lor standard (vezi, de exemplu, Harlow și colab., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)). 170

Așa cum s-a folosit aici, un "anticorp prelucrat" descrie un tip de proteină de fuziune, cu alte cuvinte, un anticorp sintetic (de exemplu, un anticorp himeric sau umanizat) în care o porțiune a domeniilor variabile ale lanțului ușor și/sau greu ale unui acceptor ales sunt înlocuite prin părți analoage de la unul sau mai mulți anticorpi donori care au specificitate pentru epitopul ales. De exemplu, asemenea molecule pot include anticorpi caracterizați printr-un lanț greu umanizat asociat cu un lanț ușor nemodificat (sau lanț ușor himeric), sau vice versa. Anticorpul prelucrat prin inginerie genetică pot fi caracterizați, de asemenea, prin modificarea secvențelor de acid nucleic care codifică regiuni cadru ale domeniului variabil ușor și/sau greu ale anticorpului receptor în scopul păstrării specificității de legare a anticorpului donor. Acești anticorpi pot cuprinde înlocuirea unuia sau mai multor CDR-uri (de preferință, toate) de la anticorpul acceptor cu CDR-uri de la un anticorp donor descris aici. 175 180

185 Un "anticorp himeric" se referă la un tip de anticorp prelucrat care conține regiunea variabilă întâlnită în mod natural (lanț ușor și lanțuri grele) derivată de la un anticorp donor în asociere cu regiunile constante ale lanțului ușor și greu derivate de la un anticorp acceptor.

190 Un "anticorp umanizat" se referă la un tip de anticorp prelucrat care are CDR-urile sale derivate de la o imunoglobulină donoare non-umană, părțile moleculei care nu sunt derivate de la aceea imunoglobulină fiind derivate de la una (sau mai multe) imunoglobuline umane. În plus, resturile cadrului suport pot fi modificate pentru a păstra afinitatea de legare (vezi, de exemplu, Quenn și colab., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86: 10029-10032(1989), Hodgson și colab., Bio/Technology, 9:421(1991)).

195 Termenul "anticorp donor", se referă la un anticorp (policlonal, monoclonal, sau recombinant) care contribuie cu secvențe de acid nucleic ale regiunilor sale variabile, CDR-uri sau alte fragmente funcționale sau analogi ai acestora la un prim partener de fuziune, astfel, încât să asigure molecula de fuziune și proteina de fuziune exprimată care rezultă cu specificitatea antigenică și activitatea de neutralizare caracteristice anticorpului donor. Un anticorp donor potrivit pentru utilizare în această invenție este un anticorp monoclonal de neutralizare non-uman (adică murin) desemnat ca 3B9. Anticorpul 3B9 este definit ca specific IL4-uman cu titru înalt (cu alte cuvinte, nu recunoaște IL4 bovină sau murină), anticorp de neutralizare al izotipului IgG₁ având ADN-ul lanțului ușor variabil și secvențele aminoacide ale SECV ID NR: 1 și 2 și ADN-ul
205 lanțului greu variabil și secvențele aminoacide ale SECV ID Nr: 3 și 4 pe o regiune constantă corespunzătoare IgG murină.

Termenul "anticorp acceptor" se referă la un anticorp (policlonal, monoclonal sau recombinant) heterolog la anticorpul donor, care contribuie cu toate (sau unele porțiuni, de preferință, toate) ale secvențelor acidului nucleic care codifică regiunile
210 cadru ale lanțurilor sale greu și/sau ușor și/sau regiunile sale constante ale lanțului său greu și/sau ușor la cel de-al doilea partener de fuziune. De preferință, un anticorp uman este anticorpul receptor.

"CDR-uri" sunt definite ca secvențele aminoacide a regiunii care determină complementaritate ale unui anticorp care sunt regiunile hipervariabile ale lanțurilor grele și ușor ale imunoglobulinei. Vezi, de exemplu, Kabat și colab., Sequences of
215 Proteins of Immunological Interest, Ed.4, U.S. Department of Health and Human Services national Institutes of Health (1987). Există trei CDR-uri lanț greu și trei CDR-uri lanț ușor (sau regiuni CDR) în porțiunea variabilă a unei imunoglobuline. Astfel, "CDR-uri" așa cum s-au folosit aici se referă la toate cele trei CDR-uri lanț greu sau
220 cele trei CDR-uri lanț ușor (sau la toate CDR-urile lanț ușor și lanț greu, dacă este corespunzător).

CDR-urile asigură majoritatea resturilor de contact pentru legarea anticorpului la antigen sau epitop. CDR-urile de interes din această invenție sunt derivate de la secvențele lanțului variabil greu și ușor ale anticorpului donor și includ analogi ai CDR-urilor întâlnite în mod natural, analogi care, de asemenea, împărtășesc sau păstrează
225 aceiași specificitate antigenică de legare și/sau capacitate de legare ca anticorpul donor de la care ei s-au derivat.

Prin "împărtășesc specificitate de legare antigenică sau capacitate de neutralizare" se înțelege, de exemplu, că deși MAb 3B9 poate fi caracterizat printr-un anumit
230 nivel al afinității antigenice și un CDR codificat printr-o secvență de acid nucleic a 3B9

Într-un mediu structural corespunzător poate avea o afinitate mai scăzută sau mai ridicată, este de așteptat să recunoască totuși același epitop(i) ca 3B9. Exemple de CDR-uri lanț greu ale 3B9 includ SECV ID NR: 22; SECV ID NR: 24; SECV ID NR: 26; și exemple de CDR-uri lanț ușor de 3B9 includ SECV ID NR: 16; SECV ID NR: 18 și SECV ID NR: 20.

235

Un "fragment funcțional" este o secvență parțial variabilă de lanț greu sau ușor (de exemplu, deleții minore la terminusul amino sau carboxi al regiunii variabile a imunoglobulinei), care păstrează aceeași specificitate de legare antigenică și/sau capacitate de neutralizare ca anticorpul de la care s-a derivat fragmentul.

Un "analog" este o secvență aminoacidică modificată prin cel puțin un aminoacid, în care numita modificare poate fi chimică sau o substituție sau o rearanjare a câtorva aminoacizi (altfel spus, nu mai mulți de 10), modificare care permite secvenței aminoacide să păstreze caracteristicile biologice, de exemplu, specificitatea antigenică și titru sau afinitate ridicată a secvenței nemodificată. De exemplu, mutațiile făcute pot fi interpretate prin intermediul substituțiilor în sensul de a crea situri de restricție endonucleazică în sau regiunile care înconjoară CDR.

240

245

Analogii pot, de asemenea, să apară ca variații alelice. O "variație sau modificare alelică" este o alterare în secvența de acid nucleic care codifică secvențele aminoacide sau peptidice ale invenției. Astfel de variații sau modificări pot fi datorate degenerescentei în cadrul genetic sau pot fi făcute deliberat prin inginerie pentru a asigura caracteristicile dorite. Aceste variații sau modificări pot sau nu pot avea ca urmare alterări în orice secvență aminoacidică. De exemplu, secvențele aminoacide ale CDR lanț ușor SECV ID NR: 16 sunt identice față de anticorpul murin 3B9 nativ sau umanizat. Cu toate acestea, această secvență CDR este codificată prin ambele SECV ID NR: 15 și SECV ID NR: 53. În mod similar, CDR cu SECV ID NR: 22 este codificată prin SECV ID NR: 21 și SECV ID NR: 54; CDR cu SECV ID NR: 24 este codificată prin SECV ID NR: 23 și SECV ID NR: 55; și CDR cu SECV ID NR: 26 este codificată prin SECV ID NR: 25 și SECV ID NR: 56.

250

255

Termenul "agenți efectori" se referă la molecule purtător neproteice la care proteinele de fuziune și/sau lanțul ușor sau greu natural sau sintetic al anticorpului donor sau alte fragmente ale anticorpului donor se pot asocia prin mijloace convenționale. Asemenea purtători neproteici pot include purtători convenționali folosiți în diagnosticare, de exemplu, polistiren sau alte bile de plastic, polizaharide, de exemplu, precum cei folosiți în sistemul BIAcore (Pharmacia), sau alte substanțe neproteice utile în domeniul medical și siguri pentru administrare la oameni și animale. Alți agenți efectori pot include un macrociclu pentru chelatizarea unui atom de metal greu sau radioizotopi. Asemenea agenți efectori pot fi utili, de asemenea, pentru creșterea timpului de înjumătățire al proteinelor de fuziune, de exemplu, polietilen glicolul.

260

265

Anticorpi monoclonali IL4 de înaltă afinitate

Pentru utilizarea în construcția anticorpilor, a fragmentelor și a proteinelor de fuziune ale acestei invenții, se poate folosi o specie non-umană (de exemplu, bovină, ovină, primată sau de la rozător (de exemplu, murină și de șobolan, etc.) pentru a genera imunoglobulina dorită cu înfățișare IL4 umană nativă sau un epitop peptidic al acesteia. Tehnicile hibridomice convenționale sunt folosite pentru a furniza o linie celulară hibrodomică care secretă un MAb non-uman față de IL4. Astfel de hibridomi sunt triați apoi folosind IL4 atașată covalent la plăci cu 96-godeuri sau alternativ cu IL4

270

275

biotinilată pentru folosire într-un test de triere, așa cum este descris în detalii în exemplul 2 de mai jos. Astfel, unul din aspectele invenției de față este o metodă pentru detectarea MAb-urilor pentru IL4 umană în care sistemele de analiză evită denaturarea IL4. În asemenea manieră, s-a descoperit că pot fi detectați MAb-uri de titru ridicat (sau înaltă afinitate) pentru IL4 umană.

Ca exemplu, pentru prima oară este descrisă producerea unui MAb de neutralizare de titru ridicat de la donor murin. MAb 3B9, care este un anticorp (donor) murin de dorit pentru utilizare în dezvoltarea unui anticorp himeric sau umanizat, este descris în detaliu în exemplul 1 de mai jos. 3B9 MAb se caracterizează printr-o specificitate de legare antigenică pentru IL4 umană, cu un K_d mai mic de $2,0 \times 10^{-10}M$ (circa $1,8 \times 10^{-10}M$) pentru IL4. K_d -ul pentru IL4 al unui fragment Fab al acestui 3B9 este mai mic decât circa $3 \times 10^{-10}M$. Epitopul acestui anticorp nu poate fi configurat la IL4 cu peptide lineare și plecând de la aceasta epitopul se consideră a fi legat la un epitop învecinat. Imaginea legării sugerează un sit de legare la regiunea buclă B-C (resturile 60 - 69) - helix C (resturile 70 - 93). Aceste regiuni se referă la desemnările hărții dată de Cook și colab., J.Mol.Bio., 218: 675 - 678 (1991), Walter și colab., J.Biol.Chem., 267:20371-20376 (1992), Wlodaver *et al.* FEBS Lett., 309: 59-64 (1992), Redfield și colab., Biochem., 30:11029-11035 (1991), Smith și colab., J.Mol.Bio., 224:899-904 (1992), Garrett și colab., (1992) și Powers și colab., Biochem., 31: 4334-4346 (1992) și Science, 256: 1673-1677(1992), încorporate aici ca referințe.

Alt anticorp donor dorit este MAb, 6A1 de șobolan. Producerea acestui MAb este dată mai jos în exemplul 7. Acest MAb se caracterizează ca fiind de izotip IgG_{2a} și având o disociere constantă pentru IL4 mai mică de $2,0 \times 10^{-10}M$ (circa $1,6 \times 10^{-10}M$). Ca și cu 3B9, epitopul țintă al acestui 6A1 nu se configurează cu peptide lineare IL4 și epitopul este considerat prin urmare a fi neînvecinat și tridimensional. Imaginea legării la muteina IL4 și activitatea sa biologică indică legarea în regiunea helixului D a IL4 umană (resturile aminoacide 109 - 127), cel mai probabil în jurul tirozinei, la restul aminoacid numărul 124.

Această invenție nu este limitată la folosirea de 3B9 MAb, 6A1 MAb sau secvențele lor hipervariabile (CDR-uri). Oricare alți anticorpi IL4 de titru înalt corespunzător caracterizați printr-o disociere constantă, egală sau mai mică decât $2 \times 10^{-10}M$ pentru IL4 umană și CDR-urile corespunzătoare anti-IL4 îi pot substitui pe aceștia. În descrierea care urmează unde anticorpul donor este identificat ca 3B9 sau 6A1, această desemnare este făcută numai pentru ilustrare și simplificarea descrierii.

Fragmente de anticorp

Invenția de față include, de asemenea, utilizarea fragmentelor Fab sau fragmentelor F(ab')₂ derivate de la MAb-uri direcționate împotriva IL4 umană. Aceste fragmente sunt utile *in vivo*, ca agenți protectori împotriva condițiilor mediate IL4 și IgE sau *in vitro* ca părți ale unui IL4 de diagnostic. Un fragment Fab conține în întregime lanțul ușor și porțiunea amino terminală a lanțului greu; un fragment F(ab')₂ este format din două fragmente Fab legate prin punți disulfurice. MAb-uri 3B9, 6A1 și alți anticorpi similari de înaltă afinitate care leagă IL4, asigură surse de fragmente Fab și fragmente F(ab')₂ care pot fi obținute prin mijloace convenționale, de exemplu, clivarea MAb cu enzimele proteolitice adecvate, papaină și/sau pepsină sau prin metode recombinante. Aceste fragmente Fab și F(ab')₂ sunt utile ele înșăle ca agenți

terapeutici, profilactici sau de diagnostic și ca donori de secvențe care includ regiunile variabile și secvențele CDR utile în formarea anticorpilor recombinanți sau umanizați asemenea celor descriși aici.

325

Secvențe aminoacide și nucleotidice anti-IL4 de interes

MAB 3B9 sau alți anticorpi descriși mai sus pot aduce secvențe precum secvențe peptidice variabile ale lanțului greu și/sau ușor, secvențe cadru, secvențe CDR, fragmente funcționale și analogi ai acestora și secvențele de acid nucleic care le codifică, utile în desemnarea și obținerea diverselor proteine de fuziune (inclusiv anticorpi obținuți prin inginerie) care sunt caracterizați prin specificitate de legare antigenică a anticorpului donator.

330

Ca un exemplu, invenția de față asigură, astfel, secvențele lanțului variabil ușor și lanțului variabil greu de la anticorpus 3B9 IL4 murin și secvențe derivate de la acesta. Regiunea variabilă a lanțului greu al lui 3B9 este caracterizat prin resturile aminoacide 20 până la 140 ale SECV ID NR: 4. Regiunile CDR sunt indicate prin sublinierea din fig.2 și sunt date în SECV ID NR: 22; SECV ID NR.:24; și secv ID NR:26. Regiunea variabilă a clonei lanțului ușor a lui 3B9 se caracterizează prin resturile aminoacide 21 la 132 din fig.1 (SECV ID NR:2). Regiunile CDR sunt de la resturile aminoacide 44-58 (SECV ID NR: 16); 74-80 (SECV ID NR: 18); și 113-121 (SECV ID NR: 20).

335

340

Sunt fuzionate regiunea variabilă a catenei grele himerice și secvențele nucleotidice semnal și aminoacide. Aceste secvențe sunt identice lanțului greu 3B9 cu excepția secvenței semnalului. Secvența semnal a lanțului greu himeric este dată de SECV ID NR: 5 și 6. Regiunile CDR sunt indicate prin sublinierea din fig.3 și sunt identice în secvența aminoacidă pentru-CDR-urile murine native (SECV ID NR: 21-26). Secvențele nucleotidice și aminoacide ale regiunii lanțului ușor himeric sunt identice secvențelor 3B9 nemodificate (resturile aminoacide 21-132 ale SECV ID NR: 2), folosind secvențele semnal naturale de șoareci (resturile aminoacide 1-20 ale SECV ID NR: 2).

345

350

O regiune variabilă a lanțului greu umanizat și secvențe semnal sunt ilustrate în fig.4 (SECV ID NR: 11 și 12). Secvența semnal este dată de asemenea, în SECV ID NR: 5 și 6. Alte secvențe semnal corespunzătoare, cunoscute pentru cel cu pregătire în domeniu, pot fi substituite pentru secvențele semnal exemplificate aici. Secvențele aminoacide CDR ale acestui construct himeric sunt date în SECV ID NR: 22 (codificată prin SECV ID NR:54), SECV ID NR: 24 (codificată prin SECV ID NR: 55) și SECV ID NR: 56 (codificată prin SECV ID NR:26).

355

Un exemplu de secvență variabilă de lanț ușor umanizat (sintetic) este ilustrat în fig.5 (SECV ID NR:13 și 14). Secvența semnal cuprinde resturile aminoacide 1 la 9 ale SECV ID NR:8. Secvențele CDR din această figură sunt desemnate prin subliniere și diferă de CDR-ul murin nativ printr-un singur aminoacid al SECV ID NR: 20. Astfel, CDR-urile lanțului ușor umanizat sunt furnizate prin SECV ID NR: 53 și 12, SECV ID NR: 17 și 18 și SECV ID NR:27 și 28. Această diferență este descrisă în detaliu în exemplul 3.

360

Secvențele de acid nucleic ale acestei invenții, sau fragmente ale acestora, care codifică lanțul ușor variabil și secvențe peptidice ale lanțului greu sunt folosite în formă nemodificată sau sunt sintetizate pentru a introduce modificări dorite, de exemplu, situri de restricție. Secvențe de acid nucleic, izolate de la cele întâlnite în

365

mod natural sau alternativ, sintetice, care sunt derivate de la MAb 3B9 sau alți anticorpi IL4 doriți de titru înalt, pot conține opțional situri de restricție pentru a facilita inserarea sau ligarea într-o secvență de acid nucleic potrivită precum cea care codifică o regiune cadru de anticorp dorit, ligare cu CDR-uri mutate sau fuziunea cu o secvență de acid nucleic care codifică un al doilea partener selectat pentru fuziune.

Luând în considerare degenerescența codului genetic, pot fi construite diverse secvențe codificatoare care codifică secvențe aminoacide care codifică lanțul variabil greu și ușor și secvențe CDR ale invenției, precum și fragmente funcționale și analogii acestora care împărtășesc specificitatea antigenică a anticorpului donor. Secvențele izolate de acid nucleic ale acestei invenții sau fragmente ale acestora, care codifică secvențe peptidice variabile ale lanțului sau CDR-uri se pot folosi pentru a produce proteine de fuziune, anticorpi himerici sau umanizați sau alți anticorpi obținuți prin inginerie genetică ai acestei invenții când s-au combinat operațional cu un al doilea partener de fuziune.

Aceste secvențe sunt, de asemenea, utile pentru introducerea mutagenică a schimburilor specifice în secvențele de acid nucleic care codifică CDR-uri sau regiuni cadru și pentru încorporarea secvenței aminoacide modificate rezultate sau de fuziune într-un plasmid pentru expresie. De exemplu, substituțiile făcute în secvența nucleotidică a regiunilor care codifică cadrul și CDR s-au folosit pentru a crea situri de restricție enzimatică care au facilitat inserția regiunilor CDR mutate (și/sau cadru). Aceste regiuni CDR s-au folosit în construcția unui anticorp umanizat al acestei invenții.

Ar fi de remarcă că, în plus față de secvențele izolate de acid nucleic care codifică porțiuni ale proteinei de fuziune și anticorpilor descriși aici, pot fi folosite alte astfel de secvențe de acid nucleic, cum ar fi, cele complementare la secvențe native. Secvențe ADN utile includ acele secvențe care hibridizează în condiții de hibridizare stringente (vezi, T. Marinatis și colab., *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), pp. 387 la 389) la secvențele ADN. Un exemplu, al unei astfel de condiție de hibridizare stringentă este hibridizarea 4 x SSC la 65°C, urmată de o spălare în 0,1 x SSC la 65°C pentru o oră. Alternativ, o condiție exemplificatoare de hibridizare stringentă este în 50% formamidă, 4 x SSC la 42°C. De preferință, aceste secvențe ADN hibridizate sunt ca mărime de cel puțin 18 nucleotide lungime, adică, aproximativ mărimea unui CDR.

Molecule de fuziune și proteine de fuziune

Molecule de fuziune pot codifica proteine de fuziune care includ anticorpilor obținuți prin inginerie, precum anticorpilor umanizați. O moleculă de fuziune dorită conține secvențe CDR care codifică peptide având specificitatea antigenică a unui anticorp IL4, de preferință, un anticorp de afinitate ridicată cum s-a asigurat prin prezenta invenției, inserat într-un prim partener de fuziune (un cadru uman sau regiunea variabilă a imunoglobulinei umane).

De preferință, primul partener de fuziune este linkat operațional la un al doilea partener de fuziune. Cel de-al doilea partener de fuziune este definit mai sus și poate include o secvență care codifică o a doua, regiune anticorp de interes, de exemplu, o regiune Fc. Așa-numiții al doilea partener de fuziune pot include, de asemenea, secvențe care codifică alte imunoglobuline la care regiunea constantă a lanțului ușor sau greu este fuzionată în cadru sau prin intermediul unei secvențe linker. Anticorpilor

obținuți prin inginerie genetică orientați împotriva fragmentelor funcționale sau analogilor IL4 pot fi desemnați pentru a provoca sporirea legării cu același anticorp. 415

Al doilea partener de fuziune poate fi asociat, de asemenea, cu agenți efectori cum s-a definit mai sus, incluzând molecule purtător neproteice, la care cel de-al doilea partener de fuziune poate fi linkat operațional prin mijloace convenționale.

Fuziunea sau linkajul dintre cei doi parteneri de fuziune de exemplu, secvențe anticorp și agentul efector, se pot face prin orice mijloace potrivite, de exemplu, prin legături convenționale covalente sau ionice, fuziuni de proteine sau linkeri reticulați hetero-bifuncționali, de exemplu, carbodiimidă, glutaraldehidă și alte asemenea. Asemenea tehnici sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise în lucrări de chimie și biochimie convențională. 420 425

Suplimentar, în molecula de fuziune pot fi, de asemenea, construite secvențe linker convenționale care asigură, simplu, mărimea dorită a spațiului dintre al doilea partener de fuziune și agentul efector. De asemenea, astfel de linkeri sunt bine-cunoscuți celor cu pregătire în domeniu.

Pentru sporirea expresiei pot fi modificate suplimentar, secvențele semnal pentru moleculele invenției. Ca un exemplu, o proteină de fuziune dorită având o secvență aminoacidă a secvenței lanțului greu murin, care este identică lanțului variabil greu himeric (V_H) din fig.2 (SECV ID NR:4), a avut peptida semnal originală înlocuită cu alte secvențe semnal (resturile aminoacide 1-20) (SECV ID NR: 6). 430

O proteină de fuziune exemplificatoare, conține o peptidă variabilă a lanțului greu și/sau ușor sau secvența proteinei având specificitatea antigenică a MAb 3B9, de exemplu, lanțurile V_H (resturile aminoacide 21-141 ale SECV ID NR: 9 și 10) și V_L (resturile aminoacide 21-132 ale SECV ID NR: 1 și 2). O altă proteină de fuziune dorită a acestei invenții se caracterizează prin secvență aminoacidă care conține, cel puțin una și, de preferință, toate CDR-urile regiunii variabile ale lanțurilor grele și/sau ușoare ale moleculei anticorpului murin 3B9, secvențe care rămân fiind derivate de la o sursă umană sau un fragment funcțional sau un analog al acesteia. Vezi, de exemplu, regiunile V_H și V_L umanizate ale SECV ID NR: 11 și 12 și SECV ID NR:13 și 14 (fig. 4 și 5). 435 440

Într-o altă realizare, anticorpul invenției obținut prin inginerie genetică poate avea atașat la el un agent suplimentar. De exemplu, poate fi folosită procedura tehnologiei ADN recombinant pentru a produce un anticorp prelucrat prin inginerie genetică conform din invenție în care fragmentul Fc sau domeniul CH_3 al moleculei complete a anticorpului a fost înlocuit printr-o enzimă sau altă moleculă detectabilă (cu alte cuvinte, o polipeptidă efectoră sau moleculă raportoare). 445 450

Cel de-al doilea partener de fuziune poate, de asemenea, să fie linkat operațional la o peptidă non-imunoglobulină, proteină sau fragment al acestora, heterolog la secvența care conține CDR, având specificitatea antigenică a 3B9 murin. Proteina rezultată poate prezenta la expresie, atât specificitate antigenică anti-IL4, cât și caracteristicile non-imunoglobulinei. Aceea caracteristică a partenerului de fuziune, poate fi, de exemplu, o caracteristică funcțională, cum ar fi o altă legare sau un alt domeniu receptor, sau o caracteristică terapeutică dacă partenerul de fuziune este el însuși o proteină terapeutică sau caracteristici antigenice suplimentare. 455

O altă proteină preferată a acestei invenții poate cuprinde o moleculă anticorp completă, având lanțurile greu și ușor de lungime întreagă sau orice fragment alcătuit 460

din elemente diferite ale acestora, ca fragmente Fab sau $F(ab')_2$, un lanț greu dimer sau orice fragment recombinant al acestora precum Fv sau un anticorp monolant (SCA) sau orice altă moleculă cu aceeași specificitate ca MAb donor ales, de exemplu, MAb 3B9 sau 6A1. Astfel de proteină poate fi folosită sub forma unei proteine de fuziune sau se poate folosi în forma sa nefuzionată.

De câte ori cel de-al doilea partener de fuziune este derivat de la alt anticorp, de exemplu, orice cadru de izotip sau clasă de imunoglobulină sau regiune constantă, rezultă un anticorp prelucrat prin inginerie. Anticorpul obținut prin inginerie pot cuprinde regiuni constante de imunoglobulină (Ig) și regiuni cadru de la o sursă, de exemplu, anticorpul acceptor și una sau mai multe (de preferință, toate) CDR-urile de la anticorpul donor, de exemplu, anticorpul anti-IL4 descris aici. În plus, se pot face modificări, de exemplu, deleții, substituții sau aditii la nivelurile acidului nucleic sau aminoacizilor regiunii cadru a domeniului variabil ușor și/sau greu al MAb acceptor, sau regiunilor CDR donoare în scopul păstrării specificității de legare antigenice a anticorpului donor.

Asemenea anticorpi obținuți prin inginerie sunt desemnați să folosească unul (sau ambele) lanțuri variabile greu și/sau ușor ale MAb IL4 (opțional modificate cum s-a descris) sau unul sau mai multe CDR-uri ale lanțului greu sau ușor identificate în continuare (vezi, exemplul 3). Anticorpul obținut prin inginerie ai invenției sunt de neutralizare, cu alte cuvinte, ei blochează legarea la receptorul proteinei IL4. De exemplu, anticorpul prelucrat prin inginerie genetică, derivat de la MAb 3B9 este orientat împotriva unui epitop proteină terțiară specific al IL4 umane, presupus a fi la regiunea buclă B-C - helix C, așa cum s-a descris mai sus.

Astfel de anticorpi prelucrați prin inginerie pot include un anticorp umanizat care conține regiunile cadru ale unei imunoglobuline umane alese sau subtip sau un anticorp himeric care conține regiuni constante ale lanțului greu și ușor uman fuzionat la fragmente funcționale de anticorp IL4. Un anticorp uman acceptor corespunzător (sau de alt animal) poate fi unul ales dintr-o bază de date convențională, de exemplu, KABAT^(R) database, Los Alamos database și Swiss Protein database, prin omologie la secvențele nucleotidice și aminoacide ale anticorpului donor. Un anticorp uman caracterizat printr-o omologie la regiunile cadru ale anticorpului donor (pe baza unui aminoacid) poate fi adecvat pentru a furniza o regiune constantă a lanțului greu și/sau o regiune cadru variabilă a lanțului greu pentru inserarea CDR-urilor donorului. Un anticorp acceptor potrivit capabil să doneze regiuni constante ale catenei ușoare sau regiuni cadru variabile se poate alege în mod similar. Ar fi de remarcat că lanțurile grele și ușoare ale anticorpului acceptor nu este necesar să fie originare de la același anticorp acceptor.

Regiunile heteroloage constante și cadru dorite sunt alese de la clase și izotipuri de imunoglobulină umană, ca IgG (subtipurile 1 la 4), IgM, IgA și IgE. Cu toate acestea, anticorpul acceptor nu este nevoie să cuprindă numai secvențe proteice de imunoglobulină umană. De exemplu, poate fi construită o genă în care o secvență ADN care codifică partea lanțului de imunoglobulină umană este fuzionată la o secvență ADN care codifică o secvență aminoacidică non-imunoglobulinică, cum ar fi, o polipeptidă efectoare sau o moleculă raportoare.

Un exemplu al unui anticorp umanizat dorit în mod special conține CDR-uri ale lui 3B9 inserate pe regiunile cadru ale unei secvențe de anticorp uman ales. Pentru

anticorpi umanizați de neutralizare, una, două sau de preferință, trei CDR-uri din regiunile variabile ale lanțului greu și/sau lanțului ușor ale anticorpului IL4 sunt înserate în regiunile cadru ale secvenței anticorpului uman ales, care înlocuiesc CDR-urile native ale ultimului anticorp.

510

De preferință, într-un anticorp umanizat, domeniile variabile în ambele lanțuri greu și ușor au fost modificate prin inginerie genetică prin una sau mai multe înlocuiri CDR. Este posibil să se folosească toate șase CDR-urile sau diverse combinații de mai puțin de șase CDR-uri. Este posibil să se înlocuiască CDR-uri numai în lanțul greu uman, folosind ca lanț ușor lanțul ușor nemodificat de la anticorpul uman acceptor. Ca alternativă, se poate selecta un lanț ușor compatibil de la alt anticorp uman recurgând la baze de date de anticorpi convenționali. Restul anticorpului modificat prin inginerie se poate deriva de la orice imunoglobulină umană acceptoare corespunzătoare.

515

Anticorpul umanizat modificat astfel prin inginerie are de preferință structura unui anticorp uman natural sau un fragment al acestuia și posedă combinarea proprietăților cerute pentru folosire terapeutică eficientă, de exemplu, tratamentul bolilor inflamatorii mediate de IL4 la om sau pentru utilizări în diagnostic.

520

Ca un alt exemplu, un anticorp modificat prin inginerie poate să conțină trei CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor al 3B9 (SECV ID NR: 16, 18, 20 și 28) și trei CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu al lui 3B9 (SECV ID NR: 22, 24 și 26). Anticorpul umanizat rezultat este caracterizat prin specificitatea de legare antigenică și afinitatea înaltă a MAb 3B9.

525

Se va înțelege de către cei specializați în domeniu că un anticorp obținut prin inginerie poate fi modificat în continuare prin schimbări în aminoacizii domeniului variabil fără să se afecțeze în mod necesar specificitatea și afinitatea ridicată a anticorpului donor (altfel spus, un analog). De exemplu, s-au construit anticorpi monoclonali umanizați în care restul aminoacid al lanțului ușor la poziția 120 a fost o arginină (SECV ID NR: 13 și 14) sau treonină (SECV ID NR: 57 și 58). Se anticipează ca aminoacizii lanțului greu și ușor pot fi substituiți prin alți aminoacizi, fie în cadrele domeniului variabil, fie în CDR-uri sau în ambele.

530

535

În plus, regiunea constantă poate fi modificată pentru a spori sau descrește selectiv proprietățile moleculelor invenției de față. De exemplu, dimerizarea, legarea la receptori Fc sau capacitatea de a lega și activa complementul (vezi, de exemplu, Angal și colab., Mol.Immunol., 30:105-108 (1993), Xu și colab., J.Biol.Chem., 269:3469-3474(1994), Winter și colab., **EP 307434-B**).

540

O proteină de fuziune care este un anticorp himeric diferă de anticorpul umanizat descriși mai sus prin asigurarea regiunilor variabile întregi ale lanțului greu și lanțului ușor ale anticorpului donor non-uman, care includ regiunile cadru, în asocieră cu regiuni constante de imunoglobulină umană pentru ambele lanțuri. Se anticipează că anticorpul himeric care păstrează în plus secvența non-umană față de anticorpul umanizat ai acestei invenții pot provoca un răspuns imun considerabil la oameni.

545

Astfel de anticorpi sunt utili în prevenirea și tratamentul tulburărilor alergice mediate de IL4, așa cum s-a discutat mai sus.

550

Producerea proteinelor de fuziune și anticorpilor prelucrați prin inginerie genetică

De preferință, secvențele variabile ale lanțului ușor și/sau greu și CDR-urile MAb 3B9 (SECV ID NR: 16, 18, 20, 22, 24 și 26) sau alți MAb-uri donori corespunzători (de exemplu, 6A1) și secvențele lor codificatoare de acid nucleic sunt utilizate în construcția proteinelor de fuziune și a anticorpilor prelucrați prin inginerie, de preferință, anticorpilor umanizați ai acestei invenții, prin următorul procedeu. Aceleași tehnici sau tehnici similare se pot folosi, de asemenea, pentru a genera alte realizări ale acestei invenții.

Un hibridom care produce un MAb donor selectat, de exemplu, anticorpul murin 3B9, se clonează convențional și se obține ADN-ul regiunilor variabile ale lanțului său greu și ușor prin tehnici cunoscute pentru un specialist în domeniu, de exemplu, tehnicile descrise în Sambrook și colab., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), ediția a-II-a, Cold Spring Harbor Laboratory (1989). Regiunile variabile grea și ușoară ale lui 3B9 care conțin cel puțin CDR-urile și acele porțiuni ale regiunii domeniului cadrului ușor și/sau greu ale MAb acceptor necesare în vederea păstrării specificității de legare a MAb donor, precum și părțile derivate care rămân de la imunoglobulină ale lanțului anticorpului derivat de la o imunoglobulină umană se obțin folosind primeri polinucleotidici și revers transcriptaza. Sunt identificate CDR-urile folosind o bază de date cunoscută și prin comparație cu alți anticorpi.

Apoi, poate fi preparat un anticorp himeric șoarece/om și analizat pentru capacitatea de legare. Un astfel de anticorp himeric conține în întregime regiunile V_H și V_L ale anticorpului non-uman donor, în asociere cu regiuni Ig constante umane pentru ambele lanțuri.

Regiuni cadru omoloage ale unei regiuni variabile de lanț greu de la un anticorp uman s-au identificat folosind baze de date computerizate, de exemplu, KABAT^(R) și s-a selectat ca anticorp acceptor, un anticorp uman având omologie la 3B9. Secvențele regiunilor variabile ale lanțului greu sintetic conținând CDR-uri 3B9 în cadrele anticorpului uman s-au desemnat cu înlocuiri nucleotidice opționale în regiunile cadru pentru a încorpora situri de restricție. Această secvență desemnată se sintetizează apoi prin oligonucleotide de suprapunere, se amplifică prin reacție polimerazică în lanț (PCR) și i se corectează erorile.

Într-o manieră similară, s-a desemnat o regiune cadru variabilă corespunzătoare de lanț ușor.

De la anticorpul himeric poate fi derivat un anticorp umanizat sau, de preferință, făcut sintetic prin inserarea CDR-urilor MAb din lanțurile greu și ușor corespunzătoare în cadrul ales al lanțului greu și ușor. Alternativ, un anticorp umanizat al invenției poate fi preparat folosind tehnici standard de mutagenезă, astfel, anticorpul umanizat rezultat conține regiunile cadru umane și CDR-uri MAb donoare. Acestea pot fi supuse ulterior manipulării resturilor cadrului. Anticorpul umanizat rezultat poate fi exprimat în celule gazdă recombinante, de exemplu, celule COS sau CHO. Detalii suplimentare ale acestei proceduri sunt furnizate în exemplul 4. Alți anticorpi umanizați pot fi preparați folosind această tehnică asupra altor anticorpi adecvați, non-umani specifici IL4, de neutralizare, de titru înalt.

Un vector de expresie convențional sau un plasmid recombinant se produce prin plasarea acestor secvențe de codificare pentru proteina de fuziune în asociere

operațională cu secvențe de control reglatoare convenționale capabile să controleze replicarea și expresia în, și/sau secreția dintr-o celulă gazdă. Secvențele reglatoare includ secvențe promotor, de exemplu, promotor CMV și secvențe semnal care pot fi derivate de la alți anticorpi cunoscuți. În mod similar, este produs un al doilea vector de expresie care are o secvență ADN care codifică un lanț complementar ușor sau greu de anticorp. De preferință, acest al doilea vector de expresie este identic primului cu excepții în măsura în care se poate ca secvențele codificatoare și markerii selectabili să fie implicați, astfel, încât să asigure cât mai mult posibil ca fiecare lanț polipeptidic să fie exprimat funcțional. 600

O celulă gazdă selectată este co-transfectată prin tehnici convenționale cu ambii vectori, primul și al doilea, sau este transfectată simplu printr-un vector unic pentru a crea celula gazdă transfectată a invenției care cuprinde ambele lanțuri ușor și greu recombinant sau sintetic. Celula transfectată se cultivă apoi prin tehnici convenționale pentru a produce anticorpul obținut prin inginerie genetică, din invenție. Anticorpul umanizat care include asocierea lanțului greu și/sau lanțului ușor, ambele recombinante, este triat din cultură printr-un test adecvat ca ELISA sau RIA. Tehnici convenționale similare se pot folosi pentru a construi alte proteine de fuziune și molecule ale acestei invenții. 605

Vectorii corespunzători pentru etapele de clonare și subclonare folosite în metodele și construirea compozițiilor acestei invenții se pot alege de către un specialist în domeniu. Unul din vectorii folosiți este pUC19, care este accesibil comercial de la furnizori ca Amersham (Buckinghamshire, Regatul Unit) sau Pharmacia (Uppsala, Suedia). Suplimentar, poate fi folosit pentru clonare orice vector care este capabil să se replice cu ușurință, are numeroase situsuri de clonare și gene marker și este ușor de manipulat. Astfel, alegerea vectorului de clonare nu este un factor limitativ în această invenție. 610

Similar, vectorii folosiți pentru expresia anticorpilor obținuți prin inginerie, conform acestei invenții, pot fi aleși de către specialistul în domeniu de la oricare dintre vectorii convenționali. Vectorii conțin, de asemenea, secvențe reglatoare selectate care sunt în asociere funcțională cu secvențele ADN care codifică regiunile imunoglobulinei și sunt capabile să orienteze replicarea și expresia secvențelor ADN heteroloage în celulele gazdă alese asemenea promotorilor CMV. Acești vectori conțin secvențele ADN descrise mai sus care codifică pentru anticorpul obținut prin inginerie sau molecula de fuziune. Alternativ, vectorii pot încorpora secvențe de imunoglobulină modificate prin încorporarea situsurilor de restricție dorite pentru manipulare cu ușurință. 615

Vectorii de expresie se pot caracteriza, de asemenea, prin gene marker corespunzătoare pentru amplificarea expresiei secvențelor ADN heteroloage, de exemplu, gena dihidrofolat reductazei (DHFR) de la mamifere sau gena de rezistență la neomicină (neo^R). Alte secvențe vector preferate includ o secvență semnal poliA, precum cea de la hormonul bovin de creștere (BGH) și secvența promotoare de beta-globină (betaglopro). Vectorii de expresie utili aici pot fi sintetizați prin tehnici bine cunoscute pentru cei cu pregătire în domeniu. 620

Componentele unor de vectori, de exemplu, repliconi, gene de selecție, intensificatori, promotori, secvențe semnal și altele asemenea, pot fi obținute din surse naturale sau se pot sintetiza prin proceduri cunoscute pentru folosire în orientarea 625

630

635

640

expresiei și/sau secretarea produsului ADN-ului recombinant într-o gazdă aleasă. Alți vectori de expresie adecvați ale căror numeroase tipuri sunt cunoscute în domeniu pentru expresia în cazul mamiferelor, bacteriilor, insectelor, drojdiilor și fungilor pot fi, de asemenea, aleși pentru acest scop.

Prezenta invenție cuprinde, de asemenea, o linie celulară transfectată cu o plasmidă recombinantă care conține secvențele care codifică anticorpii prelucrați prin inginerie genetică sau moleculele de fuziune ale acestora. Celule gazdă utile pentru clonare și alte manipulări ale acestor vectori de clonare sunt, de asemenea, convenționale. Totuși, în cea mai mare parte celulele folosite pentru replicarea vectorilor de clonare și alte etape din construcția proteinelor de fuziune ale acestei invenții sunt de la diverse tulpini *E.coli*.

Celule gazdă sau linii de celulele corespunzătoare pentru expresia anticorpului sau proteinei de fuziune din invenție sunt, de preferință, o celulă eucariotă ca CHO, COS, o celulă fibroblastică (de exemplu, 3T3) și printre altele celule mieloidă și, cel mai preferat, o celulă de mamifer ca o celulă CHO sau o celulă mieloidă. Pot să fie folosite celule umane, aceasta făcând posibilă modificarea moleculei pentru a avea aspecte de glicozilare umane. Alternativ, pot fi folosite alte linii celulare eucariote. Selecția celulelor mamifere gazdă potrivite și metode pentru transformare, cultură, amplificare, trierea și producerea produsului ca și de purificarea acestuia, sunt cunoscute în domeniu. Vezi, de exemplu, Sambrook și colab., citat mai sus.

Celulele bacteriene se pot dovedi utile pentru expresia MAb-urilor recombinante ale prezentei invenții. Totuși, datorită tendinței proteinelor exprimate în celulele bacteriene de a fi într-o formă desfășurată sau sub formă înfășurată necorespunzător sau sub formă neglicozilată, orice MAb recombinant produs într-o celulă bacteriană, va trebui să fie triat pentru menținerea capacității de legare antigenică. Dacă molecula exprimată de către celula bacteriană s-a produs într-o formă înfășurată corespunzător, acea celulă bacteriană va fi o gazdă dorită. De exemplu, diverse tulpini ale *E.coli* folosite pentru expresie sunt binecunoscute ca celule gazdă în domeniul biotehnologiilor. Diverse tulpini ale *B.subtilis*, *Spreptomyces*, alți bacili și altele asemenea pot să fie folosiți la fel în această metodă.

Unde se dorește, tulpini ale celulelor de drojdie cunoscute pentru specialiștii în domeniu sunt, de asemenea, accesibile ca celule gazdă, precum și celulele de insecte, de exemplu, *Drosophila* și *Lepidoptera* și sisteme de expresie virală. Vezi, de exemplu, Miller și colab., Genetic engineering, 8: 277-298, Plenum Press (1986) și referințele citate aici.

Metodele generale prin care pot fi construiți vectorii invenției, metodele de transfecție necesare pentru a produce celulele gazdă ale invenției și metodele de cultură necesare pentru producerea proteinei de fuziune sau anticorpului prelucrat prin inginerie ale invenției din astfel de celule gazdă, sunt toate tehnici convenționale. De asemenea, o dată produse, proteinele de fuziune sau anticorpii invenției se pot purifica din conținuturile culturii celulare, conform procedurilor standard din domeniul incluzând precipitare cu sulfat de amoniu, coloane de afinitate, cromatografie în coloană, electroforeză în gel și altele asemenea. Asemenea tehnici sunt în stadiul anterior al tehnicii și nu limitează această invenție.

Încă o altă metodă de expresie a anticorpilor umanizați poate utiliza expresia într-un animal transgenic, precum cel descris **US 4873316**. Acesta se referă la un

sistem de expresie care folosește promotorul caseinei animalului care, atunci când se încorporează transgenic într-un mamifer permite femelei să producă proteina recombinantă dorită în laptele său.

690

O dată exprimat prin metoda dorită, anticorpul obținut prin inginerie se examinează pentru activitate *in vitro* folosind un test adecvat. Formatele test ELISA, în prezent convenționale, sunt folosite pentru a testa legarea calitativă și cantitativă a anticorpului obținut prin inginerie la un epitop IL4. Suplimentar, se pot folosi, de asemenea, alte teste *in vitro*, de exemplu, BIAcore (Pharmacia), pentru a verifica eficacitatea neutralizării înainte de studiile clinice umane realizate pentru evaluarea persistenței anticorpului în organism în ciuda mecanismelor obișnuite de epurare.

695

Urmând procedurile descrise pentru anticorpii umanizați preparați de la 3B9, un specialist în domeniu poate construi, de asemenea, anticorpi umanizați de la alți anticorpi donori IL4, secvențele regiunii variabile și peptidele CDR descrise aici. Anticorpii prelucrați pot fi produși cu cadrele regiunii variabile potențial recunoscute ca "self" de către receptorii anticorpului prelucrat. Modificări minore la cadrele regiunii variabile pot fi introduse pentru a efectua creșteri mari în legarea antigenică fără o creștere apreciabilă a imunogenității pentru receptor. Astfel de anticorpi prelucrați pot trata eficient un om pentru condiții mediate de IL4. Astfel de anticorpi pot fi, de asemenea, utili în diagnosticarea unor asemenea condiții.

700

705

Utilizări terapeutice/profilactice

Această invenție se referă, de asemenea, la o metodă de tratare la oameni a unei tulburări alergice, care cuprinde administrarea unei doze eficiente de anticorpi incluzând unul sau mai mulți anticorpi sau proteine de fuziune descrise aici sau fragmente ale acestora.

710

Răspunsul terapeutic indus prin folosirea moleculelor acestei invenții se produce prin legare la IL4 umană și astfel blocarea ulterioară a eliberării IgE. Astfel, moleculele prezentei invenții în preparate și formulări corespunzătoare pentru folosire terapeutică sunt foarte necesare pentru acele persoane care prezintă un răspuns alergic, cum ar fi, rinită alergică, conjunctivite, dermatice atopice, astm atopice și șoc anafilactic.

715

Proteinele de fuziune, anticorpii, anticorpii prelucrați prin inginerie sau fragmentele acestora din această invenție se pot folosi, de asemenea, în legătură cu alți anticorpi în special MAb-uri umani reactivi cu alți markeri (epitopi) responsabili pentru condiția împotriva căreia este orientat anticorpul invenției. În mod similar, MAb-uri reactive cu epitopi responsabili pentru condiția asociată cu producerea în exces a IgG la un animal ales, împotriva căruia este direcționat anticorpul invenției, se pot folosi în compoziții veterinare.

720

Agenții terapeutici ai acestei invenții sunt considerați a fi necesari pentru tratamentul condițiilor alergice de la circa 2 zile până la circa 3 săptămâni sau, atât cât este nevoie. De exemplu, tratamente mai lungi pot fi necesare când se tratează rinita sezonieră și altele asemenea. Aceasta reprezintă un avans considerabil față de protocolul de infuzare folosit în mod obișnuit cu tratamentele anterioare ale tulburărilor mediate IL4. Doza și durata tratamentului este în legătură cu durata relativă a moleculelor prezentei invenții în circulația umană și poate fi corectată de către un specialist în domeniu în funcție de condiția de tratat și starea generală de sănătate a pacientului.

725

730

Modul de administrare al agentului terapeutic al invenției poate fi orice rută adecvată care eliberează agentul la gazdă. Proteinele de fuziune, anticorpii, anticorpii obținuți prin inginerie și fragmente ale acestora și compozițiile farmaceutice ale invenției sunt utile în mod deosebit pentru administrare parenterală, altfel spus, subcutanat, intramuscular, intravenos sau intranazal.

Agenții terapeutici ai invenției pot fi preparați sub formă de compoziții farmaceutice care conțin o cantitate eficientă a anticorpului (de exemplu, umanizat) obținut prin prelucrare în invenție, ca ingredient activ într-un purtător acceptabil farmaceutic. Ca agent profilactic, al invenției, este preferată o suspensie sau soluție apoasă care conține anticorpul prelucrat, de preferință, tamponat la pH fiziologic, într-o formă gata pentru injectare. Compozițiile pentru administrare parenterală vor cuprinde de obicei, o soluție a anticorpului prelucrat al invenției sau un amestec al acestuia dizolvat într-un purtător acceptabil farmaceutic, de preferință, un purtător apos. Poate fi folosită o diversitate de purtători apoși, de exemplu, soluție salină 0,4%, glicină 0,3% și altele asemenea. Aceste soluții sunt sterile și în general, lipsite de material granulat. Aceste soluții se pot steriliza prin tehnici de sterilizare convenționale binecunoscute (de exemplu, filtrare). Compozițiile pot conține substanțe auxiliare acceptabile farmaceutic atât cât este necesar pentru aproximarea condițiilor fiziologice, cum ar fi, pentru ajustarea pH-ului, agenți de tamponare, etc. Concentrația anticorpului invenției într-o astfel de formulare farmaceutică poate varia larg, de la mai puțin de circa 0,5%, de obicei la sau la cel puțin circa 1% până la 15 sau 20%, în greutate și se va alege pentru început pe baza volumelor de fluid, a viscozității, etc., conform modului particular de administrare ales.

Astfel, o compoziție farmaceutică pentru injectare intramusculară ar putea fi preparată pentru a conține 1 ml apă sterilă tamponată și, între circa 1 până la circa 100 mg, de exemplu, circa 50 până la circa 30 mg sau, mai preferat, circa 5 până la circa 25 mg din anticorpul prelucrat prin inginerie al invenției. În mod similar, o compoziție farmaceutică a invenției pentru infuzare intravenoasă ar putea fi făcută să conțină până la circa 250 ml soluție Ringer sterilă și circa 1 până la circa 30 și de preferință 5 mg până la circa 25 mg din anticorpul prelucrat prin inginerie al invenției. Metodele actuale pentru prepararea compozițiilor administrabile parenteral sunt bine cunoscute sau vor fi evidente pentru cel cu pregătire în domeniu și sunt descrise mai detaliat în, de exemplu, Remington's Pharmaceutical Science, ediția a 15-a, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Este de preferat ca agentul terapeutic al invenției, când este prezent într-un preparat farmaceutic să fie prezent sub formă de unități dozate. Doza terapeutică eficientă corespunzătoare se poate determina ușor de către cei cu pregătire în domeniu. Pentru a trata eficient o tulburare inflamatoare la un om sau un animal s-ar putea administra o doză, de aproximativ 0,1 până la aproape 20 mg per 70 kg greutate corporală dintr-o proteină sau un anticorp al acestei invenții parenteral, de preferință, i.m. (intramuscular). Asemenea doză poate, dacă este necesar, să fie repetată la intervale de timp selectate ca adecvate de către medic.

Invenția cuprinde, de asemenea, administrarea proteinelor de fuziune IL4 ale acestei invenții în același timp sau secvențial cu alți anticorpi sau proteine de fuziune caracterizate prin activitate anti-IL4, cum ar fi, activitatea factorului antitumoral de necroză sau alte activități farmaceutice compatibile cu capacitate de legare la

receptorul IL4 a proteinelor de fuziune ale acestei invenții. Asemenea alți anticorpi sunt accesibili comercial sau pot fi desemnați într-un mod similar celui descris aici.

780

Proteinele de fuziune și anticorpii prelucrați prin inginerie ai acestei invenții pot fi folosiți, de asemenea, în regimuri de diagnostic, cum ar fi, pentru determinarea tulburărilor mediate IL4 sau pentru urmărirea progresului tratamentului unor astfel de tulburări. Ca reactivi de diagnosticare, aceste proteine de fuziune pot fi marcate convențional pentru utilizare în ELISA și alte formate test convenționale pentru măsurarea nivelurilor IL4 în ser, plasmă sau alt țesut corespunzător. Natura testului în care sunt folosite proteinele de fuziune este convențională și nu limitează această descriere.

785

Anticorpii, anticorpii prelucrați prin inginerie sau fragmentele acestora descrise aici se pot liofiliza pentru depozitare și se pot reconstitui într-un purtător adecvat înaintea folosirii. Această tehnică s-a dovedit a fi eficientă pentru imunoglobuline convenționale și pot fi folosite tehnicile de liofilizare și reconstituire cunoscute în domeniu.

790

Următoarele exemple ilustrează diverse aspecte ale acestei invenții, incluzând construcția de anticorpi exemplificatori prelucrați prin inginerie și expresia acestora în vectori adecvați și celule gazdă și nu se vor interpreta ca limitând întinderea acestei invenții. Toți aminoacizii sunt identificați prin codurile convenționale de trei litere sau o singură literă. Toate enzimele de restricție necesare, plasmide și alți reactivi și materiale s-au obținut din surse comerciale în afara cazurilor unde s-a indicat în alt fel. Toate metodologiile de clonare, ligare și alte aspecte ale ADN recombinant s-au realizat ca în T.Maniatis și colab., citat mai sus, sau a doua ediție a acestuia (1989), editori Sembrook *et al.*

795

800

În continuare, se prezintă 9 exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...10, care reprezintă:

- fig.1, (SECV ID NR: 1 și 2) ilustrează regiunea variabilă a lanțului ușor (aminoacizii 21-132) pentru anticorpul 3B9 IL4 murin și anticorpul himeric uman/murin 3B9 precum și secvența semnal nativă (aminoacizii 1-20). Porțiunile subliniate indică CDR-uri (SECV ID NR: 15 și 16; SECV ID NR: 17 și 18; și SECV ID Nr: 19 și 20);

805

- fig.2, (SECV ID NR: 3 și 4) ilustrează regiunea variabilă a lanțului greu (aminoacizii 20-140) ai 3B9 murin și secvența semnal nativă (aminoacizii 1-19). Porțiunile subliniate indică CDR-uri (SECV ID NR: 21 și 22; SECV ID NR: 23 și 24 și SECV ID NR: 25 și 26);

810

- fig.3, (SECV ID NR: 9 și 10) ilustrează regiunea variabilă a lanțului greu (aminoacizii 21-141) ai anticorpului himeric uman/murin 3B9 și secvența sa semnal (aminoacizii 1-19). SECV ID NR:5 și 6). Porțiunile subliniate indică CDR-urile derivate de la 3B9 (SECV ID NR: 21 și 22; SECV ID NR: 23 și 24 și SECV ID NR: 25 și 26);

- fig.4, (SECV ID NR: 11 și 12) ilustrează regiunea variabilă a lanțului greu (aminoacizii 20-141) ai anticorpului umanizat 3B9 și o secvență semnal (aminoacizii 1-19). SECV ID NR: 5 și 6). Porțiunile subliniate indică CDR-urile derivate de la 3B9 (SECV ID NR: 54 și 22; SECV ID NR: 55 și 24 și SECV ID NR: 56 și 26);

815

- fig.5, (SECV ID NR: 13 și 14) ilustrează regiunea variabilă a lanțului ușor (aminoacizii 21-131)ai anticorpului umanizat 3B9 și o secvență semnal (aminoacizii 1-20). SECV ID NR: 7 și 8). Porțiunile subliniate arată CDR-urile derivate de la 3B9 (SECV ID NR: 53 și 16; SECV ID NR: 17 și 18 și SECV ID NR: 27 și 28);

820

- fig.6A, (SECV ID NR: 5 și 6) este o secvență semnal a lanțului greu folosită în exemplul 4 de mai jos;

825 - fig.6B, (SECV ID NR: 7 și 8) este o secvență semnal a lanțului ușor folosită în exemplul 4 de mai jos;

- fig.7 este un desen schematic al plasmidei pL4chhc3-pcd folosit pentru a exprima un lanț greu himeric IL4 în celule de mamifere. Plasmida conține o genă *beta*-lactamază (BETA LAC), o origine a replicării SV-40(SV40), o secvență promotor citomegalovirus (CMV), o secvență semnal, lanțul greu variabil himeric al SECV.ID NR.: 9 și 10, o regiune constantă a lanțului greu uman, un semnal poli A de la hormonul de creștere bovin(BGH), un promotor *beta*-globină, (*beta* gloptol), o genă dihidrofolat reductaza (DHFR), o altă secvență semnal poli A de la hormonul de creștere bovin (BGH) ca fond într-un pUC19;

835 - fig.8, este o reprezentare schematică a plasmidului pL4chlc-pcdn folosit pentru a exprima regiunea variabilă a lanțului ușor himeric IL4 al SECV.ID NR.:1 și 2 în celule de mamifere. Plasmida diferă de cea din fig.7 prin faptul că ea conține o regiune variabilă a lanțului ușor himeric în locul lanțului greu himeric, o regiune constantă a lanțului ușor uman și o genă neomicină (Neo) în plus la DHFR;

840 - fig.9, este o reprezentare schematică a plasmidei pL4hzhc-1-pcd folosit pentru a exprima regiunea variabilă a lanțului greu IL4 sintetic al SECV.ID NR.:11 și 12 în celule de mamifere. Plasmida diferă de cea din fig.7 conținând mai degrabă regiunea variabilă a lanțului greu umanizat decât cea a lanțului greu himeric;

845 - fig.10, este o reprezentare schematică a plasmidei pL4hzlcl-o-Pcn folosit pentru a exprima regiunea variabilă a lanțului ușor IL4 umanizat a SECV.ID NR.:13 și 14 în celule de mamifere. Plasmida diferă de cea din fig.8 conținând mai degrabă o regiune variabilă a lanțului ușor umanizat, decât lanțul ușor himeric și nu codifică gena DHFR.

Exemplul 1. Producerea de MAb 3B9

A. Procedura de imunizare

850 S-au imunizat 4 șoareci (hibrizi F1 de Balb/c și C57BL/6) subcutanat cu 50 μ g IL4 umană recombinantă *E.coli* în adjuvant Freund's complet și 4 săptămâni mai târziu s-a amplificat intraperitoneal (i.p.) cu 50 μ g IL4 în adjuvant Freund's incomplet. Pe baza unui titru bun de anticorp seric față de IL4 un șoarece a primit ulterior imunizări de 200 μ g IL4 (i.p. în ser fiziologic) la 8 săptămâni, 2 zile mai târziu cu 100 μ g IL4 (i.p. în ser fiziologic) și două zile mai târziu cu 50 μ g IL4 (i.p. în soluție salină). Două zile după imunizarea finală s-a realizat o splenectomie.

B. Procedura de fuziune și sistemul de căutare

860 S-au folosit celule splenice de șobolan pentru prepararea hibridomilor (prin proceduri standard, așa cum s-a descris, de exemplu, de către Kohler și colab., Nature, 256: 495 (1975)) de la care s-au triat mai mult de 250 clone de celule pentru secreția anticorpului față de IL4 folosind sistemul accesibil comercial BIAcore și teste ELISA, așa cum este descris mai jos pentru legare IL4. Cinci godeuri au dat un răspuns pozitiv. Numai 1 clonă de la șoareci, 3B9 a fost puternic pozitivă. Toate clonele secundare derivate de la 3B9 au fost pozitive.

Exemplul 2. Teste ELISA și constante de afinitate

A. ELISA

870 Testul de triere realizat, după cum urmează, a fost destinat să măsoare afinitatea pentru IL4 umană nativă. Pentru experimentul 1 plăci cu 96- godeuri activitate cu aldehydă s-au acoperit cu IL4 la un μ g/ml, 100 μ l/godeu în tampon borat 0,1 M,

pH = 8,5 și s-au incubat peste noapte, la temperatura camerei hIL4 s-a atașat covalent pe placă. Soluția de IL4 s-a aspirat și siturile de legare nespecifică (NSB) s-au blocat cu 1% albumină serică bovină (BSA) în tampon TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,02% NaN₃, pH = 7,4), timp de 60 min, la 37°C. După aceasta și fiecare din etapele care urmează, placa s-a spălat de 4 ori în tampon de spălare (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN₃, pH 7,4). După aceasta s-au adăugat 50 μl mediu de hibridom (sau 3B9 purificat sau fragmente Fab) și 50 μl tampon de testare (0,5% *gamma*-globulină bovină în tampon TBS) și plăcile s-au incubat 60 min, la 37°C. S-au adăugat 100 μl de anticorp antișoarece biotinitat per godeu în tampon de testare și s-a incubat ca mai sus. S-au adăugat 100 μl streptavidina conjugată cu fosfatază alcalină per godeu și s-au incubat (30 min, la 37°C). S-au adăugat 100 μl/godeu substrat PNP și s-a incubat 30 min, la 37°C. Citirile s-au făcut la o densitate optică de 405 nm.

Pentru experimentul 2, plăci acoperite cu streptavidină (100 μl/godeu, 1 μg/ml în ser fiziologic tamponat cu fosfat p25WO (PBS) s-au incubat peste noapte, la 4°C și s-au analizat după cum urmează. Soluția de streptavidină s-a aspirat și situsuri NSB s-au blocat cu 1% BSA în tampon TBS (60 min, la 37°C). După această etapă și fiecare dintre etapele care urmează plăcile s-au spălat de 4 ori în tampon de spălare. S-au adăugat 50 μl IL4 biotinitată cu 50 μl tampon de testare și s-a incubat 30 min, la 37°C. După aceasta s-au adăugat 50 μl 3B9 IgG purificat sau fragment Fab (sau mediu de hibridom) plus 50 μl tampon de testare și s-a incubat 60 min, la 37°C. S-au adăugat 100 μl conjugat IgG anti-șoarece cu fosfatază alcalină și s-a incubat 60 min, la 37°C. S-au adăugat 100 μl substrat PNP și s-a incubat 30 min, la 37°C. Citirile s-au făcut ca mai sus.

B. Calcularea afinității lui 3B9 pentru IL4

Folosind rezultatele experimentelor descrise mai sus și rezumând după cum urmează, s-a calculat K_d pentru 3B9, așa cum s-a descris în Beatty și colab., J.Immunol. Methods, 100: 173-179 (1987):

$$K_{afin} = \frac{1}{2[2Ab^* - Ab]}$$

Ab* = concentrația de Ab legată la 150 ng/ml hIL4 biotinitată

Ab = concentrația de Ab legată la 300 ng/ml hIL4 biotinitată

Constantele de disociere, K_d, s-au calculat din relația:

$$K_d = \frac{1}{K_{afin}}$$

Experiment 1: analiză ELISA pe o placă cu 96 godeuri acoperită cu streptavidină (100 ng/godeu). K_d = 2,2 x 10⁻¹⁰ M(3B9 Fab);

Experiment 2: analiză ELISA pe o placă cu 96 godeuri acoperită cu streptavidină (100 ng/godeu). K_d = 1,4 x 10⁻¹⁰ M(3B9 IgG).

C. Specificitate

MAB 3B9 recunoaște IL4 umană, dar nu recunoaște IL4 bovină sau murină. O cale pentru a determina aceasta este cea care urmează. S-a realizat o un test ELISA folosind o placă cu 96 godeuri acoperită cu IgG anti-șoarece și în continuare

blocată cu albumină serică bovină pe care s-au incubat, 60 min, la 37°C, 50 μ l 3B9 (100 ng/ml), 25 μ l IL4 non-umană și 25 μ l IL4-biotină, urmată de o spălare, fosfatază alcalină conjugată cu streptavidină și PNP.

920 În mod similar, MAb 6A1 s-a găsit a nu recunoaște IL4 bovină sau murină.

Exemplul 3. Anticorp umanizat

S-a desemnat un anticorp umanizat care să conțină CDR-uri murine într-un cadru de anticorp uman. Această versiune umanizată a anticorpului 3B9 de șoarece specific IL4 s-a preparat realizând următoarele manipulări.

925 *A. Clonare cADN*

S-au făcut clare CADN pentru lanțurile greu și ușor ale lui 3B9 din mARN extras din linia celulară hibridomică 3B9 (exemplul 1) folosind o trusă Boehringer Mannheim. Pentru sinteza primei catene s-au folosit primeri specifici, fie pentru regiunea balama de la șoarece, fie pentru regiunea constantă Kappa.

930 Primerul lanțului kappa este (SECV ID NR: 29):

5'-CTAACAATCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3'

Primerul lanțului greu gamma este (SECV ID NR: 30):

5'-GTACATATGCAAGGCTTACAACCACAATC-3'

S-a clonat cADN-ul dublu catenar direct în plasmide pGEM7f+(Promega) care
935 apoi s-au transformat în *E.coli* DH5- α (Bethesda Research Labs).

B. Secvențializarea ADN

S-au secvențat opt clone cADN de lanț greu murin și o clonă de lanț ușor murine din partea A de mai sus. Rezultatele secvențării regiunilor variabile ale acestor clone sunt prezentate în SECV ID Nr: 1, 2, 3 și 4. Fiecare clonă a conținut aminoacizi
940 cunoscuți a fi conservați printre regiunile variabile ale lanțului greu de șoarece sau regiuni variabile de lanț ușor și secvențe semnal murine. Secvențele aminoacide CDR sunt listate mai jos.

Regiunile CDR pentru lanțul greu sunt SECV ID NR: 22, 24 și 26 (aminoacizii 50-56, 71-86, și 119-129 ai SECV ID NR: 4),(vezi, fig.2). Aceste secvențe sunt codi-
945 ficate prin SECV ID NR:21, SECV ID NR: 23 și respectiv, SECV ID NR: 25. Regiunile CDR pentru lanțul ușor sunt SECV ID NR: 16, 18 și 20 (aminoacizii 45-58, 74 - 80 și 113-121 ai SECV ID NR: 2),(vezi, fig. 1). Aceste secvențe sunt codificate prin SECV ID NR: 15, 17 și respectiv, 19.

C. Selectarea cadrelor umane

După clonarea lui 3B9, secvențele aminoacide ale regiunii variabile (aminoacizii 21-132 ai SECV ID NR: 2 și aminoacizii 20 - 140 ai SECV ID NR: 4) s-au comparat
950 cu o bază de date a secvenței de imunoglobuline umane folosind bazele de date KABAT^(R) și SWISS în scopul identificării unui cadru uman pentru ambele lanțuri greu și ușor, care ar putea să se potrivească cât mai strâns în omologia de secvență pre-
955 cursoare murină. Suplimentar la aceste căutări pentru omologie de secvență, lanțurile greu și ușor s-au evaluat, de asemenea, împotriva unei baze de date poziționale gene-
rate de la modele structurale ale domeniului Fab pentru a evalua conflictele potențiale datorate substituțiilor aminoacide care pot influența prezentarea CDR. Pentru cazul de față, nu s-a detectat nici un conflict evident în căutarea structurală; prin urmare,
960 s-a folosit ADN-ul codicator dedus din cercetările omologiei secvenței aminoacide.

S-au folosit regiuni cadru de lanț greu ale unui anticorp obținut de la o imuno-
globulină mielomică umană (CDR) (E.M.Press și N.M. Hogg, Biochem.J., 117:641-

660 (1970)). Această secvență s-a dovedit a fi aproximativ 76% omoloagă (69,4% identitate) la regiunea lanțului variabil 3B9 la nivel aminoacid.

Pentru o regiune cadru variabilă corespunzătoare de lanț ușor s-a folosit secvența cadru variabilă de lanț ușor a anticorpului uman identificată în H.G.Klobeck și colab., Nucl.Acids Res., 13:6515-6529(1985). Secvența anticorpului uman s-a găsit a fi aproximativ 80,2% omoloagă (72,0% identitate) la regiunea lanțului ușor variabil 3B9 la nivel aminoacid.

Date fiind CDR-urile 3B9 murine (SECV ID NR: 15-26) și secvența anticorpului uman s-a făcut un lanț greu sintetic și s-a realizat PCR pentru a completa și în amplifica ADN-ul. Aceste secvențe s-au sintetizat prin următoarele oligonucleotide de suprapunere și s-au amplificat prin PCR. SECV ID NR: 31-37 asigură 5 oligonucleotide de suprapunere și 2 primeri PCR. Oligonucleotida 1 (SECV ID NR: 31) s-a găsit împrejurul bazelor 5-121. Oligonucleotida 2 (SECV ID NR:32) este găsită în jurul bazelor 122-241, și oligonucleotida 3 (SECV ID NR: 33) este găsită în jurul bazelor 242-361. Cei doi primeri ai benzii de bază SECV ID NR: 34 și SECV ID NR:35 înconjoară bazele 134-110 și bazele 253-230. S-au corectat orice erori în secvența configurată care s-a inserat prin PCR. S-a realizat din nou PCR folosind ca primer 5'nucleotide 1-25 SECV ID NR: 36 și ca primer 3' nucleotidele 361-341 SECV ID NR:37.

Regiunea variabilă sintetică s-a ligat în vectorul de expresie pCD alături de secvența semnal sintetică SECV ID NR: 5 și 6 din construcția catenei grele himerice alături de regiunea constantă umană IgG₁. Secvența nucleotidică semnal și V_H sintetică și secvențele aminoacide sunt date în fig.4 (SECV ID NR: 11 și 12). Secvențele aminoacide ale CDR-urilor (SECV ID NR: 22, 24 și 26) sunt identice la CDR-urile 3B9 murine. Totuși, secvențele care codifică pentru aceste CDR-uri (SECV ID NR: 54, 55 și 56) diferă de secvențele care codifică 3B9 murin (SECV ID NR: 21, 23 și 25). Vectorul de expresie rezultat, IL4 hzhcl-1-Pcd este prezentat în fig.9.

Regiunile genei CDR ale unui cadru de lanț ușor preexistent s-au digerat restrictiv, s-au îndepărtat și s-au înlocuit cu următoarele gene sintetice IL4 CDR care s-au făcut sintetic.

Pentru CDR1:

SECV ID NR:38: 5'-CTAGCTGTGTCTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGG-3'

SECV ID NR:39: CCTTGCAAGTTGATGGTGGCCCTCTCGCCCAGAGACACAG

SECV ID NR:40: TCGAGAGGCCTCCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATATGA
ACTGG

SECV ID NR:41: GGGTTTCTGCTGATACCAAGTTCATATAACTATCACCATCATAATCAACA
CTTTGGAGGCCTC

Pentru CDR2:

SECV ID NR:44: GGGCAGCCTCCTAAGTTGCTCATTTACGCTGCATCCAATCTAGAATC
TGGGGTAC

SECV ID NR:45: CCCAGAGGCTAGATTGGATGCAGCGTAAATGAGCAACTTAGGAGGCT
GCCC

Pentru CDR3:

SECV ID NR: 42: ATACTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCGAGGTTGGCGGA
GGGAC

SECV ID NR: 43: TTGGTCCCTCCGCCGAACCTCGGAGGATCCTCATTACTTTGCTGACA
GTAGT

Secvența nucleotidică semnal, lanțul V_L sintetic și secvențele aminoacide sunt date în fig.5 (SECV ID NR: 13 și 14). Secvențele aminoacide ale primelor două CDR-uri (SECV ID NR: 16 și 18) sunt identice cu CDR-urile corespunzătoare 3B9 murine. Cu toate acestea, secvența care codifică pentru primul CDR (SECV ID NR: 53) diferă de secvența care codifică 3B9 murin (SECV ID NR: 15). În plus, în ultimul CDR s-au construit 2 constructe umanizate ale secvenței aminoacide 3B9. Unul (SECV ID NR: 28), diferă printr-un singur aminoacid (SECV ID NR: 20) de secvența 3B9 murină nativă. SECV ID NR: 28 este codificată prin SECV ID NR: 27. Regiunile ușoare variabile sintetice s-au ligat în vectorul de expresie împreună cu secvența semnal (SECV ID NR: 7 și 8). Unul dintre vectorii de expresie rezultați, IL4hzlcl-O-Pcn este ilustrat în fig.10.

Aceste secvențe variabile de lanț ușor și/sau greu sintetice s-au folosit în construcția unui anticorp umanizat.

Exemplul 4. *Expresia MAb umanizat în celule COS și CHO*

S-au obținut subclone pUC18 pentru V_H pentru a se adăuga o secvență semnal obținută inițial de la un anticorp uman SECV ID NR:5. Pentru V_L s-au obținut subclone pUC18 pentru a se adăuga o secvență semnal SECV ID NR:7.

Lanțul greu umanizat derivat de la un izotip IgG₁ prezintă 89,3% omologie (84,3% identitate) la nivel aminoacid cu lanțul greu de la 3B9 murin. Acest V_H sintetic este dat în aminoacizii 20-141 ai SECV ID nr: 11 și 12.

Lanțul ușor umanizat, un lanț kappa uman prezintă 92,0% omologie (86,6% identitate) cu 3B9 la nivel aminoacid. Acest V_L sintetic (aminoacizi 21 la 131 ai SECV DINR: 13 și 14) care conțin CDR-urile 3B9 s-au desemnat și s-au sintetizat cum s-au descris mai sus pentru lanțurile grele sintetice.

Fragmentele ADN conținând semnalele lor respective lincate, fie la regiunile umanizate variabile grea sau ușoară, s-au inserat în plasmide de expresie în celule de mamifere bazate pe pUC19, care conțin promotori CMV și regiuni constante de lanț greu sau lanț ușor uman ale himerelor produse în exemplul 5 de mai jos, prin metode convenționale (Maniatis și colab., citat mai sus) pentru a da plasmide IL4hzlcl-1Pcd (lanț greu) (fig.9) și IL4hzlcl-o-Pcn), (lanț ușor) (fig.10). Plasmidele HZHC și ZHLC sunt co-transfectate în celule COS și supernatantele se analizează prin ELISA descrisă imediat mai sus pentru prezența anticorpului umanizat după 3 și 5 zile. Alt anticorp umanizat s-a construit cu izotip IgG4.

Exemplul de mai sus descrie prepararea unui exemplu de anticorp exemplificator prin inginerie. Proceduri similare pot fi urmate pentru dezvoltarea altor anticorpi prelucrați prin inginerie, folosind anticorpi anti-IL4 (de exemplu, 6A1(exemplul 7)) dezvoltat prin mijloace convenționale.

Exemplul 5. *Construcția anticorpului himeric*

A. S-a construit un lanț greu himeric prin izolarea regiunii lanțului greu variabil murin de la MAb 3B9 original de șoarece ca un fragment de restricție EcoRI-BstEII. S-a desemnat și s-a sintetizat un oligomer ADN mic care a leagă regiunea variabilă de șoarece cu regiunea constantă IgG1 umană (BstEII-Apal): primer 5': SECV.ID NR.:50: GTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCA; primer 3':SECV. ID NR.: 51: CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACG.

Aceste două fragmente s-au ligat în plasmidul pCD (vezi fig.7) (digerat cu EcoRI și Apal) care deja codifică regiunea constantă IgG1 umană. Această clonă nu s-a

exprimat; prin urmare, tipul sălbatic 5'UTR și secvența semnal s-au deletat și s-au înlocuit cu SECV.ID NR: 5 și 6. 1055

Deoarece, nu a fost accesibil un situs de restricție endonucleazică convenabil la capătul 3' al secvenței semnal s-a introdus un situs BstEII (adică, o mutație tăcută) prin intermediul PCR. S-au folosit următorii primeri PCR:

SECV.ID NR.:48: primer 5': 5'CAGGTTACCCTGAAAGAGTC3' 1060

SECV.ID NR.:49: primer 3': 5'GAAGTAGTCCTTGACCAG3.

S-a izolat apoi un fragment de restricție BstEII-PstI din acest plasmid. Apoi, s-au desemnat și sintetizat o nouă secvență semnal și 5'UTR având capetele EcoRI și BstEII.

SECV.ID NR.:46: primer 5':AATTCGAGGACGCCAGCAACATGGTGTGCA 1065

GACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGGAG

SECV ID NR:47: primer 3': GTAACCTGCCCGTAGGCACCAGAGATCCAGAGCAACAGAG AAATGAAGACCTGGGTCTGCAACACCATGTTGCTGGCGTAATCG

Lanțul ușor himeric s-a construit aplicând tehnica PCR lanțului ușor original 3B9 murin care s-a clonat în pGEM72f(+) (Promega). Primerii folosiți au fost accesibili comercial, primul invers universal pUC18 la capătul 5' (EcoRI) și un primer 3',care introduce un situs NarI (5'CATCTAGATGGCGCCGCCACAGTACGTTTGAT-CTCCAGCTT-GGTCCC3' SECV ID NR:52), folosit pentru a fuziona regiunea variabilă de șoarece la regiunea constantă umană. Această regiune variabilă s-a ligat în vectorul de expresie pCDN (EcoRI NarI) (Fig.8) care deja conține regiunea kappa, umană. 1070 1075

S-au colectat supernatantele mediilor 3 și 5 zile mai târziu și s-au analizat prin ELISA descrisă după cum urmează: plăci ELISA s-au acoperit cu 0,1 μ g dintr-un anticorp de capră specific pentru regiunea Fc a anticorpilor umani. S-au adăugat supernatantele mediilor pentru o oră. S-a adăugat un anticorp-capră conjugat cu o peroxidază de hrean specific pentru un anticorp întreg IgG uman. Aceasta a fost urmată de adăugarea substratului peroxidazic ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) pentru o oră. S-a detectat expresia anticorpului himeric. Într-o a doua ELISA supernatantele celulei COS conținând anticorpul himeric legat specific la proteina IL4 umană recombinantă. Acest rezultat a confirmat că genele care codifică un anticorp specific pentru IL4 au fost clonate. 1080 1085

B. De asemenea, s-a putut obține un lanț greu umanizat de la acest lanț greu himeric. Lanțul greu umanizat s-a desemnat prin inserarea CDR-urilor murine într-un cadru uman. Cadrul uman ales a fost cum s-a descris mai sus, secvența proteică cea mai omoloagă din baza de date pentru proteine SWISS față de V_H 3B9 murin (aminoacizii 20-140 ai SECV ID NR:4). Această secvență de lanț greu umanizat (EcoRI Apal) s-a obținut sintetic și s-a realizat PCR pentru a completa în și amplifica secvența ADN cum s-a descris mai sus. Această regiune variabilă sintetică s-a ligat în vectorul de expresie pCD (EcoRI Apal) împreună cu secvența semnal sintetică SECV ID NR: 5 și 6 de la construcția lanțului greu himeric și o regiune constantă IgG₁ umană. 1090

În mod similar poate fi derivat un lanț ușor umanizat de la lanțul ușor himeric așa cum s-a descris pentru lanțul greu. Această genă (EcoRV NarI) s-a obținut, de asemenea, sintetic. S-a ligat V_L umanizată în vectorul de expresie pCN digerat cu EcoRI NarI alături de o secvență semnal (EcoRI EcoRV). Vectorul de expresie a furnizat regiunea constantă kappa umană. 1095

1100

Exemplul 6. MAb umanizat - purificare și termodinamică

1105

Purificarea de CHO exprimat himeric și 3B9 umanizat poate fi obținută prin cromatografie de afinitate convențională de proteină A (sau G) urmată de cromatografie de schimb ionic și cromatografie pe site moleculare. Procedee similare au fost folosite cu succes pentru purificarea până la mai mult de 95% puritate a altor MAb-uri (de exemplu, pentru virusul respirator sincițial și antigenii circumsporozoitului malaric).

1110

Afinitatea și termodinamica detaliate ale legării IL4 la MAb 3B9 umanizat și 3B9 murin (exemplul 1) s-au determinat prin titrare microcalorimetrică. Această metodă măsoară reacțiile de legare pe baza căldurilor lor intrinseci de reacție (vezi, de exemplu, Wiseman și colab., Anal.Biochem.179: 131-137 (1989)). Afinitatea ambilor MAb s-a găsit a fi foarte apropiată pentru a se măsura direct la temperatura mediului. Astfel, a avut loc o abordare termodinamică: i) s-a măsurat afinitatea, la 60°C unde ea a fost suficient de slabă pentru a fi măsurată direct; și (ii) dependența de temperatură entalpiei de legare s-a măsurat, de la 30 la 60°C. Împreună, aceste date au permis calcularea afinității pe un domeniu larg de temperaturi folosind ecuația Gibbs-Helmholz.

1115

Un rezumat al termodinamicii legării IL4 la anticorpul 3B9 umanizat și murin este prezentat în tabelul 1. Pe baza schimbărilor în energia liberă, entalpie, entropie și capacitate calorică a celor doi MAb termodinamicile legării nu pot fi distinse.

1120

Tabelul 1

Termodinamica legării hIL4 la 3B9 umanizat și murin la pH=7,4 150 mM NaCl și 25°C					
MAb	K_d pmol	ΔG kcal/ mol IL4	ΔH kcal/ mol IL4	-T ΔS kcal/ mol IL4	ΔC cal/mol IL4/°K
3B9 umanizat	11	-13,6±0,6	-21,18±2	8,2±2,1	-580±160
3B9 murin	19	-13,3±0,6	-20,5±1	7,2±1,2	-660±200

1125

Afinitățile IL4 ale 3B9 umanizat și murin s-au măsurat în quadruplicat și, respectiv, duplicat.

1130

Exemplul 7. Producerea și caracterizarea MAb de șobolan

MAb 6A1, ales pentru afinitate înaltă de legare s-a derivat de la un șobolan imunizat folosind același protocol de imunizare cum s-a descris pentru șoarecele din exemplul 1. S-a selectat 6A1 din hibridomi (mai precis hibridom 3426A11CIB9) preparat de la șobolani imunizați cu IL4 umană.

1135

S-a calculat K_d pentru 6A1, așa cum s-a descris în Beatty și colab., J.Immunol.Methods, 100: 173-179 (1987) ca fiind 2×10^{-10} M.

1140

Hibridomul 3426A11CIB9 s-a depozitat pe 6 octombrie 1993 sub numărul de acces 93100620 în Colecția Europeană de culturi de celule animale (ECACC), Public Health Laboratory Service Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Regatul Unit și a fost acceptat ca un depozit de brevet în conformitate cu Tratatul de la Budapesta din 1977, care guvernează depozitul de microorganisme în scopurile procedurii de brevetare.

Exemplul 8. *Activitatea biologică a MAb: 3B9 (umanizat), 3B9(murin) și 6A1*
S-au realizat următoarele analize folosind procedurile descrise mai jos.

A. Legare de rhIL4 glicozilat

1145

Anticorpii identificați mai sus s-au obținut față de IL4 umană recombinantă neglicolizată (rhIL4), care s-a produs în *E.coli*. Din cauză că IL4 umană nativă este glicozilată a fost important să se confirme legarea la material secretat de către o linie celulară mamiferă. 3B9 se leagă la fel de bine, atât la IL4 glicozilată, cât și IL4 umană recombinantă neglicolizată și prin urmare nu este îndreptată spre un epitop, care ar putea fi mascat pe IL4 umană naturală.

1150

B. Inhibarea legării IL4 la receptor

Capacitatea lui 3B9 de a inhiba legarea IL4 la receptorul său s-a studiat folosind legarea ^{125}I -rhIL4 față de linia celulară de gibbon, MLA (ATCC TIB 201) care poartă aproximativ 6000 receptori pe celulă. Celulele MLA s-au incubat cu ^{125}I - IL4, 30 min, la 37°C. Absorbția radioactivității s-a determinat într-un container gamma după separarea ^{125}I -IL4 legată de celulă, prin centrifugare, într-un gradient de ulei. Legarea nespecifică s-a determinat prin incubare în prezență de IL4 nemarcat în exces molar de 100 x (Park și colab., J.Exp.Med., 166: 476-488 (1987)). Valoarea IC_{50} pentru IL4 nemarcat în această analiză a fost 22 pM când cantitatea de IL4 (adăugată) a fost 83 pM. Pentru 3B9 (IgG) murin intact IC_{50} a fost 63 pM și 93 pM pentru fragmentul Fab. La altă concentrație a IL4 (218 pM) cantitatea testată pentru 3B9 (IgG) murin a fost 109 pM.

1155

1160

C. Inhibarea proliferării limfocitului

Folosind metoda descrisă în J.Immunol., 193:1142-1147(1987), de Spits și colab., s-au incubat limfocite din sânge periferic uman timp de trei zile cu fitohemaglutinină, un mitogen al celulei T, pentru reglarea receptorului IL4. Celulele blastice rezultante s-au stimulat apoi trei zile în plus cu IL4. Proliferarea se măsoară prin ^3H timidină incorporată. Proliferarea celulei B s-a măsurat prin testul lui Callard și colab., din Lymfokines and Interferons. A Practical Approach, Ch. 19, p. 345, modificat după cum urmează. Celule B din amigdale s-au purificat și s-au stimulat, timp de 3 zile cu IL4 și s-au imobilizat anti-IgM. Proliferarea s-a măsurat prin încorporarea de ^3H timidină.

1165

1170

Încorporarea ^3H timidinei inhibată de 3B9(murin) de către limfocite T din sânge periferic uman s-a stimulat cu 133pM IL4 și limfocite B din amigdale umane stimulate prin 167 pM IL4. Limfocite T stimulate IL2 nu au fost afectate. IC_{50} pentru incubarea proliferării celulei T a fost 30pM, și pentru proliferarea celulei B a fost 103 pM. Valorile corespunzătoare pentru fragmentul Fab al lui 3B9(murin) au fost 108 și 393 pM.

1175

D. Inhibarea inducerii CD23

CD23 este receptorul de afinitate scăzută pentru IgE (FcERII) și este indus pe membrana celulelor B (limfocite) în repaus prin concentrații scăzute de IL4, atât cât este necesar pentru producerea IgE. Celule B purificate din amigdale umane s-au stimulat, timp de 2 zile, cu IL4. Procentul celulelor care exprimă receptorul CD23 se determină prin citometrie în flux (Defrance și colab., J.Exp.Med., 165: 1459-1467 (1987)). 3B9 (murin) a inhibat expresia CD23 pe limfocite B din amigdale umane stimulate cu 8,3 pM IL4 cu o valoare IC_{50} de 136 pM.

1180

1185

E. Inhibarea secreției IgE

Spre deosebire de alte teste unde s-a adăugat IL4 la concentrații EC_{50} (Pere și colab., Proc.Natl. Acad.Sci., 85:6880-6884 (1988), secreția IgE s-a investigat în prezența concentrațiilor de IL4 dând secreție maximă în scopul reducerii variabilității inerente din acest sistem. Proliferarea celulei T s-a măsurat după cum urmează. S-au incubat limfocite din sânge periferic uman cu IL4, între 10-18, de preferință, 12 zile. Concentrația de IgE în supernatantele culturii se determină prin ELISA.

Secreția IgE s-a inhibat prin 3B9 (murin), și fragmentul Fab al lui 3B9, în prezența a 1,7 nM IL4 dând valori IC_{50} de 1,9 și, respectiv, 5,0 nM. Experimentul s-a repetat folosind o concentrație mai scăzută de IL4, 667 pM, care a redus valoarea IC_{50} până la 0,65 nM pentru 3B9 (murin). Raportul molar al anticorpului (IgG) față de IL4 a rămas neschimbat (1:1) pe domeniile concentrațiilor examinate.

F. Rezumatul și interpretarea datelor

Rapoartele molare ale IL4 față de diferite MAb-uri necesare pentru inhibare 50% a funcției în bioteste sunt date în tabelul 2:

Tabelul 2

Activitate comparativă a MAb-urilor 3B9, 6A1 și 3B9 umanizat variante IgG1 și IgG4) în bioteste dependente IL4					
Test	IC_{50} (pM) [domeniu] _n				
	3B9 murin	3B9 murin (Fab)	6A1 de șobolan	3B9 umanizat	
				IgG1	IgG4
RBA	63[17-109] ₂	93	>50000		
celulă T	30[10-40] ₄	108	87	44[30-56] ₃	40
celulă B	103[79-120] ₃	393	187	47[10-80] ₃	79
inducere CD23	136[53-272] ₄	216	80	333	
Sintază IgE	685[370-1070] ₆	1170	623[412-833] ₂	54[35-83] ₃	406

n = numărul de teste separate realizate.

* Variantele IgG₁ și IgG₄ s-au analizat la diferite momente.

În toate analizele, cu excepția secreției IgE, IL4 s-a adăugat la concentrații ED_{50} aproximative. Rapoartele molare de anticorpi față de IL4 necesari pentru inhibare 50% au fost similare pentru 3B9 umanizat, 3B9 murin și 6A1 în două teste de proliferare a limfocitului dar au fost mai mari pentru 3B9 umanizat în testul inducției CD23. Ultimul este un test deosebit de sensibil necesitând aparent ocuparea foarte redusă a receptorului (aproximativ 5%) (Kruse și colab., EMBO J.12: 5121, 1993) și așa cum este evident din rezultatele obținute cu 3B9 murin supus variației analizei intermediare.

O comparație a activităților 6A1 de șobolan și 3B9 murin a demonstrat un profil similar al efectelor funcționale, dar un eșec neașteptat al 6A1 de a inhiba în întregime legarea IL4 marcat cu iod radioactiv la receptorul său. IL4 marcată cu iod radioactiv folosită în testul de legare la receptor este considerată a fi marcată cu iod radioactiv la tirozina de la poziția 124. Când s-a comparat capacitatea lui 6A1 de a inhiba expresia CD23 indusă fie prin IL⁴ nemarcată sau marcată s-a constatat că inhibiția a fost mai puțin eficientă împotriva ligandului marcat cu iod radioactiv. Aceste rezultate arată că 6A1 se leagă la IL4 în regiunea însă fără să fie specifică a tirozinei 124.

1230

Astfel, pe baza datelor curente, 6A1 este un anticorp de neutralizare de înaltă afinitate care se leagă la o regiune a IL4 foarte diferită, decât 3B9.

1235

Exemplul 9. Farmacocinetică

Farmacocinetica lui 3B9 umanizat s-au investigat în șobolani masculi Sprague Dawley. S-a administrat 3B9 umanizat la 4 animale ca un bol iv dozat la 1 mg/kg, și s-a continuat prelevarea de probe de sânge, timp de 5 săptămâni după administrare. Concentrațiile plasmatice de 3B9 umanizat s-au determinat folosind o ELISA sandwich IL4/IgG anti-uman desemnată pentru a confirma nu numai prezența IgG, în circulația sanguină umană, ci, de asemenea, și capacitatea sa de a se lega la IL4 umană recombinantă.

1240

Rezultatele acestui studiu sunt prezentate pe scurt în tabelul 3:

1245

Tabelul 3
Farmacocinetica 3B9 umanizat în șobolani masculi
Sprague-Dawley (doză: bol iv 1 mg/kg)

	Clp (ml/h/kg)
Șobolan 1	0,442
Șobolan 2	0,655
Șobolan 3	0,555
Șobolan 4	0,447
Medie	0,525
Abatere standard	0,101

1250

1255

Clp=epurare plasmatică aparentă

Datele au indicat că variabilitatea între animale a fost relativ mică și dispariția 3B9 umanizat din plasă pare a fi bifazică. Epurarea plasmatică aparentă a fost scăzută (0,5 ml/h/kg). Timpul de înjumătățire pare a fi, de 11 zile. Astfel, caracteristicile farmacocinetice ale 3B9 umanizat derivat în celula CHO sunt conforme cu alți anticorpi monoclonali umanizați la șobolani. Timpul de înjumătățire în circulație, lung, al 3B9 umanizat la șobolani sugerează, de asemenea, că administrat de om 3B9 umanizat va fi la fel de eficient pe o perioadă îndelungată de timp.

1260

1265

Numeroase modificări și variații ale prezentei invenției, incluse în descrierea de mai sus, vor fi evidente pentru un specialist în domeniu. De exemplu, regiunile cadrului uman sau modificările acestora altele, decât în anticorpii descriși mai sus, pot fi folosiți în construirea de anticorpi umanizați. Astfel de modificări și alterări ale compozițiilor și procedeele invenției de față sunt considerate a fi cuprinse în sfera revendicărilor anexate prezentei descrieri.

1270

Revendicări

1275 1. Anticorp recombinant monoclonal, **caracterizat prin aceea că** regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde, în ordine, prima regiune determinantă a complementarității având secvența Thr Ser Gly Met Gly Val Ser (SECV NR. 22), a doua regiune determinantă a complementarității având secvența His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser (SECV NR. 24), a treia regiune determinantă a complementarității având secvența Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Phe Asp Val (SECV NR. 26); iar regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde, în ordine, prima regiune determinantă a complementarității având secvența Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn (SECV NR. 16), a doua regiune determinantă a complementarității având secvența Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser (SECV NR. 18), a treia regiune determinantă a complementarității având secvența Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr (SECV NR. 20).

2. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se leagă la același epitop ca anticorpul monoclonal 3B9.

3. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se leagă la același epitop ca anticorpul monoclonal 6A1.

1290 4. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, concurează cu anticorpul monoclonal 3B9 și 6A1 pentru legarea interleukinei 4 umane.

1295 5. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, concurează cu anticorpul monoclonal produs prin linia de celule hibridoma 3426A11C1B9 pentru legarea interleukinei 4 umane.

6. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are specificitate de legare a regiunii invariabile a lanțului greu de imunoglobulină, a regiunii invariabile a lanțului ușor de imunoglobulină, sau a ambelor.

1300 7. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** prezintă o disociere constantă egală sau mai mică de $2 \times 10^{-10} \text{M}$, pentru interleukina 4 umană.

8. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** regiunea invariabilă a lanțului greu cuprinde, în ordine, următorii aminoacizi 21-50, 58-71, 88-119 și 131-141 ai SECV NR. 12.

1305 9. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** regiunea invariabilă a lanțului ușor cuprinde, în ordine, următorii aminoacizi 20-42, 58-72, 80-111 și 121-131 ai SECV NR. 14.

1310 10. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** este legat operațional la un agent efector ales dintr-un grup care constă dintr-o moleculă purtătoare, polistiren și bile de plastic.

11. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** acidul nucleic care codifică proteinele din regiunea determinantă a complementarității a lanțului greu de imunoglobulină este ales dintre:

ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC

SECV NR. 21

1315 CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC TAT AAC CCA TCC

CTG AAG AGC

SECV NR. 23

RO 116809 B1

AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC	SECV NR. 25	
ACC TCC GGT ATG GGT GTT TCC	SECV NR. 54	
CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC AAA CGT TAC AAC CCG AGC CTG		
AAA TCC	SECV NR. 55	1320
CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC GAC GTT	SECV NR. 56	
12. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că acidul nucleic care codifică proteinele din regiunea determinantă a complementarității a lanțului ușor de imunoglobulină este ales dintre:		
AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC		1325
	SECV NR. 15	
AAG GCC TCC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC		
	SECV NR. 53	
GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT	SECV NR. 17	
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG	SECV NR. 19	1330
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG	SECV NR. 27	
13. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că poate fi folosit într-o metodă de diagnosticare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces a imunoglobulinei E la om prin contactarea unei probe de fluid biologic cu titru înalt pentru IL-4 cu anticorpul monoclonal recombinant și detectarea prezenței sau absenței complexului dintre IL-4 și anticorpul monoclonal recombinant.		
		1335
14. Anticorp recombinant monoclonal, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se obține prin cultivarea unei linii de celule transfectate cu plasmida recombinantă care conține acidul nucleic care codifică proteinele din regiunea determinantă a complementarității, sub controlul secvențelor reglatoare selectate, capabile să conducă expresia acestuia în celule.		
		1340
15. Compoziție farmaceutică, caracterizată prin aceea că , conține 0,5...20%, în greutate, anticorp recombinant monoclonal definit în revendicarea 1 și un purtător acceptabil farmaceutic.		
		1345
16. Metodă de tratare a alergiilor și a altor condiții asociate cu producerea în exces a IgE la un om, caracterizată prin aceea că se administrează o compoziție farmaceutică definită în revendicarea 15, astfel, încât cantitatea de anticorp recombinant monoclonal definit în revendicarea 1, să fie cuprinsă, în intervalul 0,1...20 mg/70 kg corp, parenteral, de preferință, intramuscular, un interval, de timp cuprins între 2 zile până la 3 săptămâni.		
		1350
17. Metodă de tratare, conform revendicării 16, caracterizată prin aceea că dozele și durata de tratament pot fi corectate prin determinarea anticorpilor din circulație.		
18. Metodă de tratare, conform revendicării 16, caracterizată prin aceea că este tratată rinita alergică, conjunctivitele, dermatitele atopice, astmul atopice și șocul anafilactic.		
		1355

LISTA DE SECVENȚE

(I) INFORMAȚIE GENERALĂ:	1360
(i) SOLICITANT: Holmes, Stephen D.	
Gross, Miotchell S.	
Sylvester, Daniel R.	

RO 116809 B1

1365 (ii) TITLUL INVENȚIEI: ANTICORPI IL4 recombinanți utili în
tratamentul tulburărilor mediate IL4.

(iii) NUMĂRUL SECVENȚELOR: 58

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ

(A) ADRESANT: SmithKline Beecham Corporation

(B) STRADA: Corporate Intellectual Property,
1370 UW 2220-709 Swedeland Rd.

(C) ORAȘ: King of Prussia

(D) STAT: PA

(E) ȚARA: SUA

(F) ZIP: 19406-2799

1375 (v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER:

(A) TIPUL DE MEDIU: Floppy disk

(B) COMPUTER: PC compatibil IBM

(C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/ms-dos

(D) SOFTWARE: Patentin Release Nr. 1.0, versiune 1.25

1380 (vi) DATA CURENTE ALE CERERII:

(A) NUMĂRUL, CERERII: U508/136 783

(B) DATA DEPUNERII: 14-OCTOMBRIE-1992

(C) CLASIFICARE:

(viii) INFORMAȚIE DESPRE MANDATAR/AGENT:

1385 (A) NUME: Sutton, Jeffrey A.

(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 34, 028

(C) REFERINȚĂ/NUMĂR DOSAR: p50186-2

(ix) INFORMAȚIE DE TELECOMUNICARE:

(A) TELEFON: (215) 270-5024

1390 (B) TELEFAX: (215)-5090

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV ID NR: 1:

(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 396 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

1395 (C) ÎMPLETIRE : dublă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICA:

(A) NUME/COD: CDS

1400 (B) LOCALIZARE: 1...396

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI SECV ID NR: 1:

ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA 48
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

1405 GGC TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT 96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala

20 25 30

GTG TCT CTA GGG CAG AGG CGG ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT 144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser

RO 116809 B1

35	40	45	1410
GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA	192		
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
50 55 60			
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT	240	1415	
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser			
65 70 75 80			
GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC	288	1420	
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr			
85 90 95			
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT	336		
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys			
100 105 110			
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG	384	1425	
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
115 120 125			
GAA ATC AAA CGG	396		
Glu Ile Lys Arg			1430
130			

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.2

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME : 132 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr.2:

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
1					5				10					15	

1445

1450 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

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

1455 Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

1460 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

1465 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg
130

1470

(2) INFORMAȚIA PENTRU SECV. ID NR.3

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

- (A) LUNGIME : 483 aminoacizi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NUME/COD: CDS
- (B) LOCALIZARE: 64...483

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr.3:

RO 116809 B1

GAATTCGCGG CCGCTATGCA GGGACAATCA GCAGCAGCAA TGAGGAAGTA AGCCTGTGCA	60	1490
GAT ATG AAC AGG CTT ACT TCC TCA TTG CTG CTG CTG ATT GTC CCT GCA	108	
Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala		
1 5 10 15		
TAT GTC CTG TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG	156	1495
Tyr Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu		
20 25 30		
CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TCT GGG TTT TCA	204	
Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser		
35 40 45		1500
CTG AGC ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG CCT TCA GGA	252	
Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly		
50 55 60		
AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC	300	1505
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg		
65 70 75		
TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC TCC	348	
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser		
80 85 90 95		1510
AGC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT	396	
Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr		
100 105 110		
GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC	444	1515
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe		
115 120 125		
GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	483	
Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		1520

1525

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.4:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME : 140 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

1530

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 4:

1535

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30

1540

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

1545

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
 85 90 95

1550

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

1555

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

1560

1560

1565

1565

1565

1565

1565

1570

1570

1570

1570

1575

48

48

48

48

60

60

60

1580

1585

1585

1585

1585

1590

1590

1590

1595

1

5

10

15

Gly Ala Tyr Gly

20

1600

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 7

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME : 60 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

1605

(C) ÎMPLETIRE: dublă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICA:

1610

(A) NUME/COD: CDS

(B) LOCALIZARE: 1...57

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 7:

1615

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

GTC CAC TCC
 Val His Ser

57

1620

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 8

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 19 aminoacizi

1625

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 8:

1630

RO 116809 B1

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

1635

Val His Ser

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 9

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

1640

(A) LUNGIME: 423 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: dublă

1645

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS

1650

(B) LOCALIZARE: 1...423

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 9:

ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TTG CTC TGG ATC TCT
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

48

1655

GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG
Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu
20 25 30

96

CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA
Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser
35 40 45

144

1660

CTG AGC ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG CCT TCA GGA
Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly
50 55 60

192

1665

1670 AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC 240
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
 65 70 75 80

1675 TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC TCC 288
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
 85 90 95

AGC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT 336
 Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr
 100 105 110

1680 GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC 384
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe
 115 120 125

1685 GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 423
 Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 10

- 1690 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME : 141 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- 1695 (ii) TIPUL MOLECULEI: proteină
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 10:

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

1700 Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu
 20 25 30

Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser
 35 40 45

1705

RO 116809 B1

Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
85 90 95

Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe
115 120 125

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 11

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 423 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: dublă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS

(B) LOCALIZARE: 1...423

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 11:

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG CGT GAA TCC GGT CCG GCA CTA GTT
Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val
20 25 30

AAA CCG ACC CAG ACC CTG ACG TTA ACC TGC ACC TTC TCC GGT TTC TCC
Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser
35 40 45

CTG TCG ACC TCC GGT ATG GGT GTT TCC TGG ATC CGT CAG CCG CCG GGT
Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
50 55 60

RO 116809 B1

1755 AAA GGT CTA GAA TGG CTG GCT CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC AAA CGT 240
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
 65 70 75 80

TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC CGT CTG ACG ATA TCC AAA GAC ACC TCC 288
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
 85 90 95

1760 CGT AAC CAG GTT GTT CTG ACC ATG ACT AAC ATG GAC CCG GTT GAC ACC 336
 Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr
 100 105 110

1765 GCT ACC TAC TAC TGC GCT CGA CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC 384
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe
 115 120 125

GAC GTT TGG GGT CGT GGT ACC CCA GTT ACC GTG AGC TCA 423
 Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

1770

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 12

- 1775 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME: 141 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- 1780 (ii) TIPUL MOLECULEI: proteină
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 12

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

1785 Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val
 20 25 30

Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser
 35 40 45

1790 Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
 50 55 60

RO 116809 B1

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
65 70 75 80

1795

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
85 90 95

Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr
100 105 110

1800

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe
115 120 125

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

1805

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 13

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

1810

(A) LUNGIME: 393 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: dublă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

1815

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS

(B) LOCALIZARE: 1...393

1820

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 13:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

48

GTC CAC TCC GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCG CTA GCT GTG
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
20 25 30

96

TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG GCC TCC CAA AGT GTT
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

144

GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG
Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

192

1835

1840 CAG CCT CCT AAG TTG CTC ATT TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG 240
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

1845 GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC 288
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTA TAC TAC TGT CAG 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

1850 CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG 384
Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

1855 ATC AAA CGT 393
Ile Lys Arg
130

1860 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 14
(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME : 131 aminoacizi
(B) TIP: aminoacid
(D) TOPOLOGIE: lineară

1865 (ii) TIPUL MOLECULEI: proteinei
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 14:

1870 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
20 25 30
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45
Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

RO 116809 B1

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu 1885
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu 1890
115 120 125

Ile Lys Arg
130

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 15 1895

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 45 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: dublă 1900

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS 1905

(B) LOCALIZARE: 1...45

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 15:

AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC 45
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn 1910
1 5 10 15

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 16

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 15 aminoacizi 1915

(2) (B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 16: 1920

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

- 1925 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 17
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME: 21 baze perechi
- 1930 (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
- 1935 (ix) CARACTERISTICĂ:
- (A) NUME/COD: CDS
- (B) LOCALIZARE: 1...21
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 17:

GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

21

- 1945 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 18
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME : 7 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- 1950 (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIPUL MOLECULEI: proteină
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 18:

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 19
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME: 27 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- 1960 (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- 1965 (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ: 1970

(A) NUME/COD: CDS

(B) LOCALIZARE: 1...27

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 19:

1975

CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr

1

5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 20

1980

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME : 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

1985

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 20:

1990

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr

1

5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 21

1995

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 21 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: dublă

2000

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS

2005

(B) LOCALIZARE: 1...21

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 21:

ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

1

5

21

2010

- 2015 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 22
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME : 7 aminoacizi
- 2020 (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIPUL MOLECULEI: proteină
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 22:

2025

Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Ser
1				5		

- 2030 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 23
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME: 48 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- 2035 (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
- (ix) CARACTERISTICĂ:
- 2040 (A) NUME/COD: CDS
- (B) LOCALIZARE: 1...48
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 23:

2045

CAC	ATT	TAC	TGG	GAT	GAT	GAC	AAG	CGC	TAT	AAC	CCA	TCC	CTG	AAG	AGC	48
His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	
1				5				10					15			

- 2050 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 24
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME : 16 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- 2055 (D) TOPOLOGIE: lineară

- (ii) TIPUL MOLECULEI: proteină 2060
- (iii) IPOTETICĂ: NU
- (vi) ANTI-SENS: NU
- (v) TIP FRAGMENT: intern 2065
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 24:

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

2070

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 25

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ : 2075
- (A) LUNGIME: 33 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută 2080
- (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
- (ix) CARACTERISTICĂ:
- (A) NUME/COD: CDS 2085
- (B) LOCALIZARE: 1...33
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 25:

AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC
Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

33 2090

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 26

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ : 2095
- (A) LUNGIME : 11 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă 2100

2105 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 26:

Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

2110

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 27

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

2115

(A) LUNGIME: 27 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: dublă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

2120

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(ix) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS

(B) LOCALIZARE: 1...27

2125

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 27:

CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg
1 5

27

2130

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 28

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

2135

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

2140

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 28:

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg
1 5

2145

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 29

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ : 2150
- (A) LUNGIME: 36 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: simplă 2155
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 29: 2160

CTAACTCA TTCCTGTTGA AGCTCTTGAC AATGGG

36

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 30 2165
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME: 29 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: simplă 2170
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 30: 2175

GTACATATGC AAGGCTTACA ACCACAATC

29

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 31 2180
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
- (A) LUNGIME : 117 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: simplă 2185
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 31: 2190

2195 GGTACCGCTG CGTGAATCCG GTCCGGCACT AGTTAAACCG ACCCAGACCC TGACGTTAAC 60
CTGCACCTTC TCCGGTTTCT CCCTGTCGAC CTCGGGTATG GGTGTTTCCT GGATCCG 117

2200 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 32

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 120 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2205 (C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 32:

2210 TCAGCCGCCG GGTAAAGGTC TAGAATGGCT GGCTCACATC TACTGGGACG ACGACAAACG 60
TTACAACCCG AGCCTGAAAT CCGCTCTGAC GATATCCAAA GACACCTCCC GTAACCAGGT 120

2215

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 33

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 120 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

2225 (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 33:

2230 TGTTCTGACC ATGGACCCGG TTGACACCGC TACCTACTAC TGGGCTCGTC GCGAAACCGT 60
TTTCTACTGG TACTTCGACG TTTGGGGTCTG TGGTACCCCA GTTACCGTGA GCTCCCAACC 120

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 34

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

2235

- (A) LUNGIME: 25 baze perechi 2240
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: simplă
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută 2245
- (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 34:

ACCGGGCGGC TGACGGATCC AGGAA

2250

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 35
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ : 2255
 - (A) LUNGIME: 24 baze perechi
 - (B) TIP: acid nucleic
 - (C) ÎMPLETIRE: simplă
 - (D) TOPOLOGIE: necunoscută 2260
- (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 35:

2265

ATGGTCAGAA CAACCTGGTT ACGG

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 36 2270
- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
 - (A) LUNGIME: 25 baze perechi
 - (B) TIP: acid nucleic
 - (C) ÎMPLETIRE: simplă 2275
 - (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 36:

2280

TTCGGGTAC CCTGCGTGAA TCCGG

2285

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 37**(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :****(A) LUNGIME: 21 baze perechi****(B) TIP: acid nucleic**

2290

(C) ÎMPLETIRE: simplă**(D) TOPOLOGIE: necunoscută****(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)**

2295

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 37:**CCAACCCCTCG AGTGCCATTG A**

2300

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 38**(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :****(A) LUNGIME: 43 baze perechi****(B) TIP: acid nucleic**

2305

(C) ÎMPLETIRE: simplă**(D) TOPOLOGIE: necunoscută****(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)**

2310

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 38:**CTAGCTGTGT CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGG**

2315

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 39**(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :****(A) LUNGIME: 39 baze perechi****(B) TIP: acid nucleic**

2320

(C) ÎMPLETIRE: simplă**(D) TOPOLOGIE: necunoscută****(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)**

2325

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 39:

CCTTGCAGTT GATGGTGGCC CTCTCGCCCA GAGACACAG

2330

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 40

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 67 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2335

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 40:

2340

TCGAGAGGCC TCCCAAAGTG TTGATTATGA TGGTGATAGT TATATGAAGT GGTATCAGCA

60

GAAACCC

67

2345

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 41

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 63 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2350

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 41:

2355

GGGTTTCTGC TGATACCAGT TCATATAACT ATCACCATCA TAATCAACAC TTTGGGAGGC

60

CTC

63

2360

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 42

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 51 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2365

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

2370

- (iii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 42:

2375

ATACTACTGT CAGCAAAGTA ATGAGGATCC TCCGAGGTTT GCGGAGGGA C

51

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 43

2380

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 53 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2385

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 43:

2390

CTTGGTCCCT CCGCCGAACC TCGGAGGATC CTCATTACTT TGCTGACAGT AGT

53

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 44

2395

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 55 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2400

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 44:

2405

GGGCAGCCTC CTAAGTTGCT CATTACGCT GCAICCAATC TAGAATCTGG GGTAC

55

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 45

2410

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 51 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2415

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

2420

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 45:

CCCAGATTCT AGATTGGATG CAGCGTAAAT GAGCAACTTA GGAGGCTGCC C

51

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 46

2425

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 83 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2430

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 46:

2435

AATTCGAGGA CGCCAGCAAC ATGGTGTTC AGACCCAGGT CTTCAATTTCT CTGTTGCTCT

60

GGATCTCTGG TGCCCTACGGG CAG

83

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 47

2440

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 84 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

2445

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: necunoscută

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 47:

2450

GTAACCTGCC CGTAGGCACC AGAGATCCAG AGCAACAGAG AAATGAAGAC CTGGGTCTGC

60

AACACCATGT TGCTGGCGTC CTCG

84

2455

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 48

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME: 20 baze perechi

2460

(B) TIP: acid nucleic

- 2465 (C) ÎMPLETIRE: simplă
(D) TOPOLOGIE: necunoscută
(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 48:

2470

CAGGTTACCC TGAAGAGTC

20

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 49

- 2475 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME: 18 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: simplă
2480 (D) TOPOLOGIE: necunoscută
(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 49:

2485

GAAGTAGTCC TTGACCAG

18

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 50

- 2490 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME: 31 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: simplă
2495 (D) TOPOLOGIE: necunoscută
(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 50:

2500

GTCACCGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGG C

31

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 51

- 2505 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME: 22 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic

- (C) ÎMPLETIRE: simplă 2510
 (D) TOPOLOGIE: necunoscută
 (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 51: 2515

CTTGGTGCTA GCTGAGGAGA CG

22

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 52 2520
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
 (A) LUNGIME: 47 baze perechi
 (B) TIP: acid nucleic
 (C) ÎMPLETIRE: simplă 2525
 (D) TOPOLOGIE: necunoscută
 (ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 52: 2530

CATCTAGATG GCGCCGCCAC AGTACGTTTG ATCTCCAGCT TGGTCCC

47

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 53 2535
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
 (A) LUNGIME: 45 baze perechi
 (B) TIP: acid nucleic
 (C) ÎMPLETIRE: dublă 2540
 (D) TOPOLOGIE: necunoscută
 (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 53: 2545

AAGGCCTCCC AAAGTGTTGA TTATGATGGT GATAGTTATA TGAAC

45

- (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 54 2550
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
 (A) LUNGIME: 21 baze perechi

- 2555 (B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: dublă
(D) TOPOLOGIE: necunoscută
(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
2560 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 54:

ACCTCCGGTA TGGGTGTTTC C

21

- 2565 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 55

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME: 48 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: dublă
(D) TOPOLOGIE: necunoscută
(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
2570
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 55:
2575

CACATCTACT GGGACGACGA CAAACGTTAC AACCCGAGCC TGAAATCC

48

- 2580 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 56

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME: 33 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: dublă
(D) TOPOLOGIE: necunoscută
(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
2585
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 56:
2590

CGCGAAACCG TTTTCTACTG GTACTTCGAC GTT

33

- 2595 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 57

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

RO 116809 B1

- (A) LUNGIME: 393 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: necunoscută
- (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
- (ix) CARACTERISTICA:
- (A) NUME/COD: CDS
- (B) LOCALIZARE: 1...393
- (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 57:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
1 5 10 15		
		2615
GTC CAC TCC GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCG CTA GCT GTG	96	
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val		
20 25 30		
TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG GCC TCC CAA AGT GTT	144	
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val		2620
35 40 45		
GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG	192	
Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
50 55 60		
		2625
CAG CCT CCT AAG TTG CTC ATT TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG	240	
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly		
65 70 75 80		
GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC	288	
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu		2630
85 90 95		
ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTA TAC TAC TGT CAG	336	
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln		
100 105 110		
		2635
CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAA GTG GAG	384	
Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu		
115 120 125		
ATC AAA CGT	393	
Ile Lys Arg		2640
130		

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 58

2645

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ :

(A) LUNGIME : 131 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

2650

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID nr. 58:

2655

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
20 25 30

2660

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

2665

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

2670

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

2675

Ile Lys Arg
130

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**Examinator: **biochim. Eremia Laura**

Lanț ușor anticorp 3B9 murin

Secvența semnal și regiune variabilă nativă

Secvența nucleotidică SECV ID NR: 1

Secvența aminoacidă SECV ID NR: 2

ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC	39
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu	
1 5 10	
TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA	78
Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln	
15 20 25	
TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC	117
Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala	
30 35	
ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT	156
Thr Ile Ser Cys <u>Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp</u>	
40 45 50	
GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA	195
<u>Gly Asp Ser Tyr Met Asn</u> Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
55 60 65	
CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA	234
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr <u>Ala Ala Ser Asn Leu</u>	
70 75	
GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT	273
<u>Glu Ser</u> Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	
80 85 90	
GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG	312
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu	
95 100	
GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG	351
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Cys <u>Gln Gln Ser Asn Glu</u>	
105 110 115	
GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC	390
<u>Asp Pro Pro Thr</u> Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
120 125 130	
AAA CGG	396
Lys Arg	

Fig. 1

Lanț greu anticorp 389 murin

Secvență somnal și regiune variabila nativă

Secvență nucleotidică SECV ID NR: 3

Secvența aminoacidă SECV ID NR: 4

GAATTCGCGG CCGCTATGCA GGGACAATCA GCAGCAGCAA	40
TGAGGAAGTA AGCCTGTGCA GAT ATG AAC AGG CTT ACT TCC Met Asn Arg Leu Thr Ser 1 5	81
TCA TTG CTG CTG CTG ATT GTC CCT GCA TAT GTC CTG TCC Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser 10 15	120
CAG GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG CAG Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln 20 25 30	159
CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly 35 40 45	198
TTT TCA CTG AGC ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile 50 55	237
CGT CAG CCT TCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His 60 65 70	276
ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG Ile Tyr Trp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu 75 80	315
AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC TCC AGC AAC Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn 85 90 95	354
CAG GTA TTC CTC AAG ATC ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp 100 105 110	393
ACT GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe 115 120	432
TAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val 125 130 135	471
ACC GTC TCC TCA Thr Val Ser Ser 140	483

Fig. 2

RO 116809 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 07 D 201/16;

Lanț greu anticorp himeric uman/389 murin

Secvență semnal și regiune variabilă

Secvența nucleotidică SECV ID NR: 9

Secvența aminoacidă SECV ID NR: 10

ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TTG CTC	39
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu	
1 5 10	
TGG ATC TCT GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG AAA GAG	78
Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu	
15 20 25	
TCT GGC CCT GGG ATA TTG CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT	117
Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser	
30 35	
CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA CTG AGC ACT TCT	156
Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser <u>Thr Ser</u>	
40 45 50	
GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG CCT TCA GGA AAG	195
<u>Gly Met Gly Val Ser</u> Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys	
55 60 65	
GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC	234
Gly Leu Glu Trp Leu Ala <u>His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp</u>	
70 75	
AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC	273
<u>Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser</u> Arg Leu Thr Ile	
80 85 90	
TCC AAG GAT ACC TCC AGC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC	312
Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile	
95 100	
ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT GCC ACA TAC TAC TGT	351
Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
105 110 115	
GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC	390
Ala Arg <u>Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val</u>	
120 125 130	
TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	423
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
135 140	

Fig. 3

Lanț greu anticorp 389 umanizat

Secvență semnal și regiune variabilă

Secvență nucleotidică SECV ID NR: 11

Secvență aminoacidă SECV ID NR: 12

ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TTG CTC	39
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu	
1 5 10	
TGG ATC TCT GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG CGT GAA	78
Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu	
15 20 25	
TCC GGT CCG GCA CTA GTT AAA CCG ACC CAG ACC CTG ACG	117
Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr	
30 35	
TTA ACC TGC ACC TTC TCC GGT TTC TCC CTG TCG ACC TCC	156
Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	
40 45 50	
GGT ATG GGT GTT TCC TGG ATC CGT CAG CCG CCG GGT AAA	195
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
55 60 65	
GGT CTA GAA TGG CTG GCT CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC	234
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp	
70 75	
AAA CGT TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC CGT CTG ACG ATA	273
Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile	
80 85 90	
TCC AAA GAC ACC TCC CGT AAC CAG GTT GTT CTG ACC ATG	312
Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met	
95 100	
ACT AAC ATG GAC CCG GTT GAC ACC GCT ACC TAC TAC TGC	351
Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
105 110 115	
GCT CGA CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC GAC GTT	390
Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val	
120 125 130	
TGG GGT CGT GGT ACC CCA GTT ACC GTG AGC TCA	423
Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser	
135 140	

Fig. 4

Lanț ușor anticorp 389 umanizat

Secvența semnal și regiune variabilă

Secvența nucleotidică SECV ID NR: 13

Secvența aminoacidă SECV ID NR: 14

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA	39
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr	
1 5 10	
GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT	78
Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser	
15 20 25	
CCA GAC TCG CTA GCT GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC	117
Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr	
30 35	
ATC AAC TGC AAG GCC TCC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT	156
Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly	
40 45 50	
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG CAG	195
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
55 60 65	
CCT CCT AAG TTG CTC ATT TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA	234
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu	
70 75	
TCT GGG GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG	273
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
80 85 90	
ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA	312
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu	
95 100	
GAT GTG GCA GTA TAC TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT	351
Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp	
105 110 115	
CCT CCG AGG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA	390
Pro Pro Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
120 125 130	
CGT	393
Arg	

Fig. 5

Secvență semnal
 Secvență nucleotidică SECV ID NR: 5
 Secvență aminoacidă SECV ID NR: 6

ATG	GTG	TTG	CAG	ACC	CAG	GTC	TTC	ATT	TCT	CTG	TTG	CTC	39
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	
1				5					10				

TGG	ATC	TCT	GGT	GCC	TAC	
Trp	Ile	Ser	Gly	Ala	Tyr	
	15					

Fig. 6A

Secvență semnal
 Secvență nucleotidică SECV ID NR: 7
 Secvență aminoacidă SECV ID NR: 8

ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	39
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	
1				5					10				

GCT	ACA	GGT	GTC	CAC	TCC	GAT	ATC	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	78
Ala	Thr	Gly	Val	His	Ser	Asp							
	15					20							

Fig. 6B

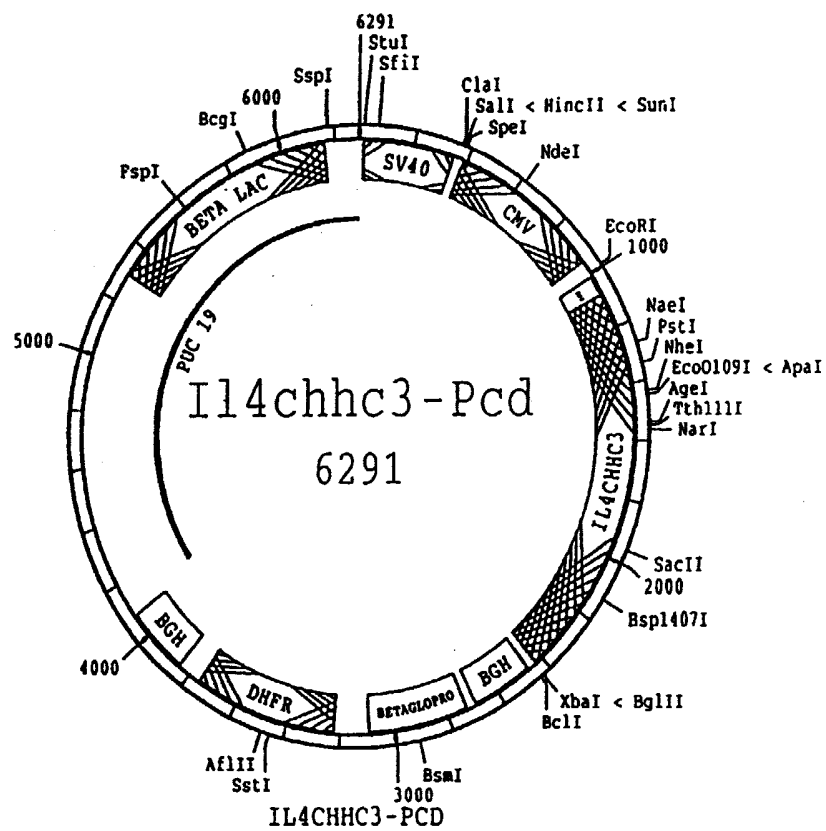


Fig. 7



Fig. 8

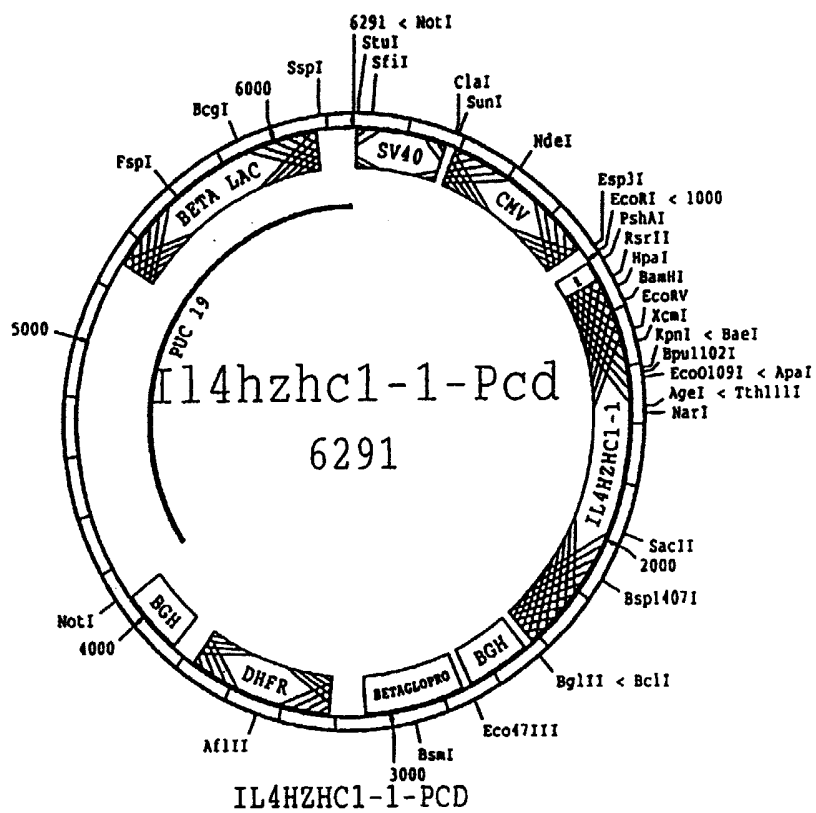


Fig. 9

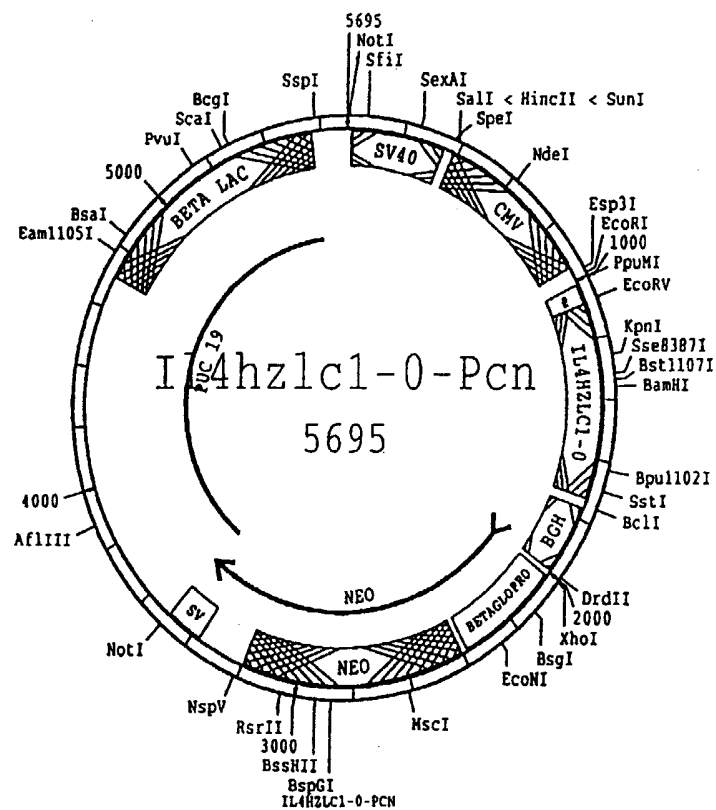


Fig. 10

