



(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: 96-02287	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: 02.06.1995	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: 08.06.1994 DE P 44 19 913.9; 02.09.1994 DE P 44 31 297.0	(86) Cerere internațională PCT: Nr. EP 95/02126 02.06.1995
(41) Data publicării cererii: BOPI nr.	(87) Publicare internațională: Nr. WO 95/33771 14.12.1995
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 30.10.2003 BOPI nr. 10/2003	(56) Documente din stadiul tehnicii: <i>The Journal of cell biology</i>; WO 95/00658
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant:	BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, INGELHEIM AM RHEIN, DE; FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH, KARLSRUHE, DE
(73) Titular:	BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, INGELHEIM AM RHEIN, DE; FORSCHUNG- SZENTRUM KARLSRUHE GMBH, KARLSRUHE, DE
(72) Inventatori:	ADOLF GUNTHER R., VIENA, AT; PATZELT ERIK, PURKERSDORF, AT
(74) Mandatar:	ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI

(54) **ANTICORP RECOMBINANT ACTIV ÎMPOTRIVA CD44v6**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un anticorp împotriva unui epitop cuprins în secvența de aminoacizi codificată de exonul 6 variabil al genei CD44, la o linie celulară hibridom, la un derivat de anticorp care se poate obține prin modificarea chimică sau enzimatică a acestui anticorp, la un anticorp recombinant cu idiotipul acestui anticorp,

la o compoziție farmaceutică care cuprinde ca ingredient activ anticorpul sau un derivat al acestui anticorp și la utilizarea unui anticorp sau a unei molecule de anticorp în metode de diagnosticare *in vivo* sau în afara corpului uman sau animal.

Revendicări: 17
Figuri: 6



Invenția se referă la un anticorp monoclonal activ împotriva unui epitop, care este codificat de varianta Exon 6 variabil a genei CD44, la molecule de anticorp derivate din acesta precum și la utilizarea anticorpului respectiv precum și a moleculei de anticorp în diagnosticare și terapie.

Sunt cunoscuți anticorpi monoclonali împotriva epitopilor, care se codifică de Exonul 6 variabil (v6). (Hofmann M., Rudy W., Zöller M., Tölg C., Ponta H., Herrlich P., and Günthert U. *CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. Cancer Res.* 51:5292-5297 1991; Wielenga, 1993). Din cauza folosului potențial ridicat, pe care astfel de anticorpi le-ar putea avea în diagnoză și în terapie, există o necesitate ridicată de anticorpi cu proprietăți îmbunătățite.

S-a dovedit recent, că expresia de variante ale glicoproteinei de suprafață CD44 este necesară și suficientă pentru a declanșa o comportare așa zisă spontană metastatică, atât într-o linie de celule de adenocarcinom de pancreas care nu este în curs de metastază a șobolanului, cât și într-o linie de celule de fibrosarcom care nu este în curs de metastază a șobolanului (Günthert U., Hofmann M., Rudy W., Rever S., Zöller M., Haußmann I., Matzku S., Wenzel A., Ponta H., and Herrlich P. *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell* 65: 13-24 (1991). În timp ce cea mai mică izoformă CD44, forma standard CD44s (sau CD44std) este exprimată ubicvitarian într-un șir de țesuturi diverse, din care celule epiteliale, anumite variante de împreunare de CD44 (CD44v, CD44 var) sunt exprimate numai într-o subgrupă de celule epiteliale. Variantele CD44 se obțin prin împreunare alternativă în așa fel, încât secvențe de 10 Exoni (v1-v10) sunt decupate complet în CD44s, totuși în variantele mai mari pot apare în diferite combinații (Screaton G.R., Bell M.V., Jackson D.G., Cornelis F.B., Gerth U., și Bell J.I. *Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12160-12164, 1992; Iölg și colab., 1993, Hofmann și colab., 1991). Variantele se deosebesc prin aceea că într-un loc anumit al părții extracelulare a proteinei sunt înserate diferite secvențe de amino acizi. Astfel de variante au putut să fie confirmate în diferite celule tumorale umane și în țesuturi tumorale umane. Astfel, s-a cercetat recent expresia variantelor de CD44 în cursul genezelor carcinoamelor colorectale (Heider K.-H., Hofmann M., Horst E., van den Berg F., Ponta H., Herrlich P., and Pals, S.T. *A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J. Cell Biol.* 120:227-233 (1993a). Expresia variantelor CD44 lipsește în epiteliul de colon uman normal și se poate dovedi numai o expresie slabă în celulele în curs de proliferare ale criptelor. În stadiile mai târzii ale dezvoltării tumorilor, de exemplu, în carcinoamele de adenom, toate degenerările maligne exprimă variante de CD44. Expresii în țesuturi ale variantelor de CD44 la nivel superior s-au putut dovedi în limfomenele agresive Non-Hodgkin (Koopman G., Heider K.-H., Horts E., Adolf G.R., van den Berg F., Ponta H., Herrlich P., Pals, S.T. *Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. J. Exp. Med.* 177: 897-904 (1993).

Se pare că Exon v6 joacă un rol deosebit mai ales la extinderea metastatică (Rudy W., Hofmann M., Schwartz-Albiez R., Zöller M., Heider K.-H., Ponta H., Herrlich P., *The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: Each one individually suffices to confer metastatic behaviour. Cancer Res.* 53: 1262-1268 (1993). În modelul animal anticorpii au putut să acționeze împotriva epitopilor specifici și să împiedice stabilirea celulelor în curs de metastază și creșterea metastazelor (Seiter S., Arch R., Reber S., Komitowski D., Hofmann M., Ponta H., Herrlich P., Matzku S., Zöller M. *Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. J. Exp. Med.* 177: 443-455 (1993). În carcinoamele de colon expresia v6 se corelează cu progresul tumorii

(Wielenga V.J.M., Heider K.-H., Offerhaus G.J.A, Adolf G.R., van den Berg F.M., Ponta H., Herrlich P., Pals S.T. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. <i>Cancer Res.</i> 53: 4754-4756 (1993). În carcinoamele de stomac expresia v6 este un marcator de diagnosticare important la diferențierea dintre tumori de tip intestinal de cele de tip difuz. (Heider K.-H., Dämmrich J., Skroch-Angel P., Müller-Hermelink, H-K., Vollmers H-P., Herrlich P., and Ponta H. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal-and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. <i>Cancer Res.</i> 53: 4197-4203 (1993b). Expresia v6 a fost măsurată în ambele lucrări menționate ultimele cu ajutorul anticorpilor împotriva epitopilor specifici v6.	50
Problema pe care o rezolvă invenția este să pună la dispoziție un anticorp împotriva unui epitop cuprins în secvența de aminoacizi codificată de exonul 6 variabil al genei CD44, la linia celulară Hybridoma cu numărul de depozitare DSM ACC2174, la un derivat de anticorp, la un anticorp recombinant cu ediotipul anticorpului, la o compoziție farmaceutică cu acest anticorp și la utilizarea unui anticorp sau a unei molecule de anticorp.	55
Anticorpul împotriva unui epitop cuprins în secvența de aminoacizi codificată de exonul 6 variabil al genei CD44 este anticorpul VFF-18 produs de către linia celulară hibridom cu numărul de depozitare DSM ACC2174.	60
Linia celulară hibridom are numărul de depozitare DSM ACC2174.	65
Derivatul de anticorp este obținut prin modificarea chimică sau enzimatică a unui anticorp VFF-18.	
Anticorpul recombinant care are ediotipul unui anticorp VFF-18.	70
Compoziția farmaceutică care cuprinde ca ingredient activ un anticorp sau un derivat de anticorp.	
Utilizarea unui anticorp sau a unei molecule de anticorp în metodele de diagnosticare în afara corpului uman sau animal, sau pentru prepararea unei substanțe pentru diagnosticare <i>in vivo</i> .	75
Scopul invenției de față este să pună la dispoziție un anticorp, care să aibe proprietăți îmbunătățite în mod semnificativ față de anticorpii specifici v6 cunoscuți. Acest scop a putut să fie atins cu invenția de față. Ea se referă la un anticorp cu denumirea VFF-18. Invenția se mai referă la o linie de celule Hybridoma, care secernează acest anticorp și care a fost depusă sub numărul de depunere DSM ACC2174 la DSM - Colecția Germană pentru Micro-organisme și Culturi de Celule GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germania.	80
În cele ce urmează prin noțiunea de anticorp și molecule de anticorpi se înțelege nu numai imunoglobuline complete, ci și substanțe echivalente în ceea ce privește specificitatea de legare și afinitatea, cum ar fi derivații de anticorpi descriși și moleculele de anticorpi recombinante.	85
Anticorpul VFF-18, conform invenției, s-a obținut printr-un procedeu conform exemplului 1. Anticorpul mai poate fi obținut din linia de celule Hybridoma depusă. Specialistul obișnuit în materie știe să obțină derivați ai anticorpului conform invenției sau, pornind de la o analiză secvențială a acestui anticorp și/sau cu utilizarea liniei de celule Hybridoma, care produce acești anticorpi, să producă molecule de anticorpi recombinante cu același idiotip, adică molecule de anticorpi, care prezintă în zona de legătură a antigenului (complementary determining regions, CDR) aceeași secvență de aminoacid ca anticorpul VFF-18. Astfel de derivați și molecule de anticorpi recombinante sunt de aceea cuprinse în mod clar în invenția de față.	90
Din imunoglobulina completă a anticorpului VFF-18 se pot obține, de exemplu, fragmente Fab sau F(ab') ₂ sau alte fragmente. (Kreitman R.J., Hansen H.J., Jones A.L., FitzGerald D.J.P., Goldenberg D.M., Pastan I. Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins	95

containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res.* 53: 819-825 (1993). Pentru procedee de diagnosticare se pot lega molecule de anticorpi VFF-18, fragmente din acestea sau molecule de anticorpi recombinante cu același idiotip, de exemplu cu izotopiradioactivi cum ar fi ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sau compuși radioactivi (Larson S.M., Cheung N-K, Leibel S.A. *Radioisotope Conjugates*. In: DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.). *Biologic therapy of cancer*. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 496-511 (1991); Thomas G.D., Dykes P.W., Bradwell A.R. *Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling*. In: Catty D. (Hrsg.). *Antibodies*. IRL Press Oxford, 223-244 (1989), 223-244; Srivastava S.C. (Hrsg.). *Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy*. Life Sciences Series A 152, Plenum New York (1989)), enzime cum ar fi peroxidaza sau fosfataza alcalină (Catty D., Raykundalia, C. *ELISA and related immunoassays*. In: Catty D. (Hrsg.). *Antibodies Vol.II*. IRL Press Oxford (1989), 97-152, s. S. 105-109) cu substanțe colorante de fluorescență (Johnson G.D. *Immunofluorescence*. In: Catty D. (Hrsg.). *Antibodies Vol.II* IRL Press Oxford (1989), 179-200, s. S. 180-189) sau molecule de biotină (Guesdon J.I., Ternynck T., Avrameas S. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1131 (1979). Pentru aplicări terapeutice molecule de anticorpi derivate din VFF18 sau VFF-18 se pot lega cu toxine (Vitetta E.S., Stone M., Amlot P., Fay J., May R., Till M., Newman J., Clark P., Collins R., Cunningham D., Ghetie V., Uhr J. W., Thorpe P.E. *Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphom*. *Cancer Res.* 51: 4052-4058 (1991); Vitetta E. S, Thorpe P.E. *Immunotoxins*. In: De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.). *Biologic therapy of cancer*. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 482-495 (1991); Kreitman R.J., Hansen H.J., Jones A.L., FitzGerald D.J.P., Goldenberg D.M., Pastan I. *Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice*. *Cancer Res.* 53: 819-825(1993); Theuer C.P., Kreitman R.J., FitzGerald D.J., Pastan I. *Immunotoxins made with a recombinant form of pseudomonas exotoxin A that donot require proteolysis for activity*. *Cancer Res.* 53: 340-3471, (1993), Cytostatica (Schrappé M., Bumol T.F., Apélgren L.D., Briggs S.L., Koppel G.A., Markowirz D.D., Mueller B.M., Reisfeld R.A. *Long-term growth suppression of human glioma xenografts by chemoimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9.2.27*. *Cancer Res.* 52: 3838-3844, (1992), Prodrugs (Wang S-M, Chern J_W, Yeh M-Y, Ng J.C., Tung E. Roffler S.R. *Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy*. *Cancer Res.* 52: 4484-4491 (1992); Senter P. D., Schreiber G.J., Schreiber G.J., Hirschberg D.L., Ashe S.A., Hellström I. *Enhancement of the in vitro and in vivo antitumor activities of phosphorylated mitomycin C and etoposide derivatives by monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugates*. *Cancer Res.* 49: 5789-5792 (1989) sau cu substanțe radioactive. Anticorpul mai poate fi legat cu o citochină sau cu o altă polipeptidă imunomodulatoare, de exemplu, cu un factor de necroză a tumorii sau cu interleuchină-2.

Specialistul în materie mai are posibilitatea, după analiza secvenței de amino acid a anticorpului VFF-18 sau/și cu utilizarea liniei de celule Hybridoma, care produce acest anticorp, să producă molecula de anticorp recombinantă mai ales a informației genetice conținută în acesta, cu același idiotip ca VFF-18. În stadiul tehnic actual se găsesc asemenea procedee. Astfel de molecule de anticorpi pot fi, de exemplu, anticorpi umanizați (Shin S-U, Morrison S.L. *Production and properties of chimeric antibody molecules*. *Methods Enzymol.* 178:459-476, (1989); Güssow D., Seemann G. *Humanization of monoclonal antibodies*. *Methods Enzymol.* 203: 99-121 (1991), anticorpi bispecfici (Weiner L.M., O'Dwyer J., Comis R.L., Frankel A.E., Bauer R.J., Kopnrad M.S., Groves E.S. *Phase I evaluation of an anti-breast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate*.

Cancer Res. 49: 4062-4067 (1989); Goodwin D.A. A new approach to the problem of targeting specific monoclonal antibodies to human tumors using anti-hapten chimeric antibodies. *J. Nucl. Med. Biol.* 16: 645 (1989), anticorpi single-chain (cu un singur lanț) (scFv, Johnson S., Bird R.E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98 (1991), imunoglobuline complete sau fragmente (Coloma M.J., Hastings A., Wims L.A., Morrison S.L. Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J. Immunol. Methods* 152: 89-104 (1992); Nesbit M., Fu Z F, McDonald-Smith J., Steplewski Z., Curtis P.H. Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from a baculovirus expression system. *J. Immunol. Methods* 151: 201-208 (1992); Barbas C.F., Björling E., Chiodi F., Dunlop N., Cababa D., Jones T.M., Zebedee S.L., Persson M A A, Nara P.L., Norrby E., Burton D.R. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9339-9343 (1992), sau anticorpi obținuți prin chain shuffling (amestecare de lanț) (Winter G., Griffith A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H. R. Making antibodies by phage display technology. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 433-455 (1994). Anticorpi umanizați se pot obține, de exemplu, prin grefă CDR (EP 0239400). Se pot modifica și regiuni din structură (EP 0519596). Pentru umanizarea de anticorpi se pot aplica azi metode cum ar fi, PCR (vezi, de exemplu, EP 0368684 și 0438310; WO 9207075) sau modelare cu computerul (vezi, de exemplu, WO 9222653). Se pot produce și proteine de fuziune, de exemplu, anticorpi cu un singur lanț/ proteine de fuziune cu toxine (Chaudhary V.K. Batra J. K., Galdo M. G., Willingham M. C., Fitzgerald D.J., Pastan I. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1066 (1990); Friedman P. N., McAndrew S.J., Gawlak S.L., Chace D., Trail P.A., Brown J.P., Siegall C.B. BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* 53: 334-339 (1993).

De aceea, astfel de molecule de anticorpi sunt, de asemenea, incluse în invenție.

De asemenea, specialistul în materie este în măsură să stabilească epitopul exact al VFF-18 și cu această cunoaștere să producă anticorpi echivalenți cu aceeași specificitate de legare. Acest lucru poate avea loc, de exemplu, prin studii de legare a peptidelor ca în exemplul 2, de exemplu, prin variația peptidei Hul. Astfel de anticorpi sunt de aceea, de asemenea, incluși în invenție.

Un alt aspect al invenției este utilizarea VFF-18 sau a moleculelor de anticorpi derivate din VFF-18 sau echivalente pentru diagnosticare și terapie.

Metodele de diagnosticare pot fi procedee cunoscute în sine cu utilizarea de molecule de anticorpi, conform invenției, de exemplu, imunoteste cuplate cu enzime (ELISA, Catty et Raykundalia, 1989), radioimunoteste (Catty et Murphy, 1989), procedee imuno-histochemice (Heider și colab., 1993b) sau Western Blots. Astfel de procedee pot fi realizate în mod adecvat cu probe de țesuturi sau lichide din corp, prelevate de exemplu din biopsii. Cercetările pot avea loc calitativ, semicantitativ sau cantitativ. Anticorpul sau molecula de anticorp se poate folosi în acest caz așa cum s-a descris în stadiul tehnic actual pentru alți anticorpi v6-specfici (WO9500851), proprietățile avantajoase ale anticorpilor, conform invenției, sau a moleculei de anticorp, conform invenției, însemnând o îmbunătățire semnificativă a unor astfel de procedee.

Pe lângă diagnosticarea *in vitro*, moleculele de anticorpi, conform invenției, se pretează și diagnosticări *in vivo*, mai ales a tumorilor. Dacă molecula de anticorp poartă o denumire detectabilă, atunci o detectare a denumirii poate avea loc pentru scopuri diagnostice, de exemplu, vizualizarea tumorii *in vivo*, sau, de exemplu, pentru chirurgie pe bază de unde

radio. Pentru utilizarea anticorpilor conjugați cu izotoni radioactivi, de exemplu, pentru imunoscintigrafie (Imaging) există o serie de protocoale, pe baza cărora specialistul în materie poate realiza invenția (Siccardi A.G., Buraggi G.L., Callegaro L., Colella A.C., DeFilippi P.G. și colab. *Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabeled F(ab')₂ fragments of an anti-carcino-embryonic antigen monoclonal antibody: a multicenter study.* *Cancer Res.* 49: 3095-3103 (1989); Keenan A.M., Weinstein J.N., Carrasquillo J.A., Bunn P.A., Reynolds J.C., Foon K.A. și colab. *Immunolymphoscintigraphy and the dose dependence of ¹¹¹In-labeled T101 monoclonal antibody in patients with cutaneous T-cell lymphoma.* *Cancer Res.* 47: 6093-6099 (1987); Perkins A.C., Pimm M.V. A role for gamma scintigraphy in cancer immunology and immunotherapy. *Eur. J. Nucl. Med.* 19: 1054-1063 (1992); Colcher D., Esteban J., Carrasquillo J.A., Sugarbaker P., Reynolds J.C., Bryant G., Larson S.M., Schlom J. Complementation of intracavitary and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with carcinoma. *Cancer Res.* 47: 4218-4224 (1987); Thompson C.H., Stacker S.A., Salehi N., Lichtenstein M., Leyden M.J., Andrews J.T. Immunoscintigraphy for detection of lymph node metastases from breast cancer. *Lancet* 1984 (2): 1245-1247 (1984).

O aplicare terapeutică poate avea loc, de exemplu, în mod analog cu utilizarea de anticorpi 1.1ASML (Seiter și colab., 1993). În acest caz aplicarea poate avea loc sistemic sau topic, de exemplu, prin injectare/infuzie intravenoasă (ca pilulă mare sau ca infuzie de durată), interaperitoneală, intramusculară, subcutanată sau altfel de injectare/infuzie. Se pot face perfuzii asupra unui singur organ sau membru. În stadiul tehnic actual se găsesc procese-verbale pentru administrarea de anticorpi conjugați sau neconjugați (fie că sunt sub formă de imunoglobuline, fragmente, molecule armonizate recombinante și altele asemănătoare). (Mulshine J.L. Magnani J.L., Linnoila R.I.: *Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors.* In: DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.). *Biologic therapy of cancer.* J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 563-588 (1991); Larson S.M., Cheung N-K V., Leibel S.A. *Radioisotope Conjugates.* In: DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.). *biologic therapy of cancer.* J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 496-511 (1991); Vitetta E.S. Thorpe P.E. *Immunotoxins.* In: DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.). *Biologic therapy of cancer.* J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 482-495 (1991); Vitetta E.S., Stone M., Amlot P., Fay J., May R., Till M., Newman J., Clark P., Collins R., Cunningham D., Ghetie V., Uhr J.W., Thorpe P.E. *Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma.* *Cancer Res.* 51: 4052-4058 (1991); Breitz H.B., Weiden P.L., Vanderheyden J.L., Appelbaum J.W., Bjorn M.J., Fer M F, Wolf S.B., Ratcliff B.A., Seiler C.A. Foisie D.C., Fisher D.R., Schroff R.W., Fritzberg A.R., Abrams P.G. *Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials.* *J. Nucl. Med.* 33: 1099-1112 (1992); Press O.W., Eary J.F., Badger C.C., Martin P.J., Appelbaum F.R., Levy R., Miller R., Brown S., Nelp W.B., Krohn K.A., Fisher D., DeSantes K., Porter B., Kodd P., Thomas E.D. Bernstein I. D. *Treatment of refractory Non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled MB-1 (anti-CD37) antibody.* *J.Clin.Oncol.* 7:1027-1038 (1989); Weiner L.M., O'Dwyer J., Kitson J. Comis R.L., Frankel A.E., Bauer R.J., Kopnrad M.S., Groves E.S. *Phase I evaluation of anti-breast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate.* *Cancer Res.* 49:4062-4967 (1989); Chatal J-F, Saccavini J-C, Gestin J-F, Thédrez P., Curtet C., Kremer M, Guerreau D., Nolié D., Fumoleau P., Guillard Y. *Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas.* *Cancer Res.* 49: 3087-3094 (1989); Sears H. F., Mattis J., Herlyn D., Häyry P., Atkinson B., Ernst C., Steplewski Z., Koprowski H., *Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours .* *Lancet* 1082 (1): 762-765 (1982).

Proprietățile superioare ale VFF-18 față de alți anticorpi anti-CD44 v6 sunt arătate în exemplele 2 până la 4. 245

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

În continuare, se prezintă 4 exemple de realizare a invenției în legătură cu figurile, care reprezintă:

- fig.1, reprezentare schematică a proteinei de fuziune GST-CD44(v3-v10). GST = Glutathion-S-transferază a Schistosomiei Japonicum. V3-v10 = inserții variate de cheratinozite -CD44. Săgeata marchează un loc de scindare a trombinei. 250

- fig.2, comparația secvențelor de Exon v6 ale genei CD44 între om și șobolan. Secvențele peptidelor Ral și Hul, se leagă la anticorpii 1.1AS;L (anti-șobolan CD44v6) și VFF-18 (Anti-uman CD44v6), sunt evidențiate îngroșat. Aminoacizii identici sunt marcați printr-o steluță. 255

- fig.3, legătura dintre anticorpii specifici CD44v6 la peptide sintetice. Legătura anticorpilor cu peptide a fost determinată într-un ELISA, în care peptidele au fost imobilizate și apoi s-au incubat cu soluții de anticorpi. După treptele corespunzătoare de creștere s-a dovedit că anticorpii legați cu peroxidază-anticorpi IgG anti-șoarece conjugat. (A): în prima experimentare s-a dovedit legătura anticorpului specific pentru șobolani CD44v6 1.1ASML la peptida Ral (KWFEN EWQGK NPPT). (B): într-o altă încercare s-a sintetizat o peptidă omoloagă la Ral din secvența umană CD44v6. S-au legat la această peptidă Hul (QWFGN RWHEG YRQT) diferiți supernatanți de hybridom CD44v6 anti-uman. În acest caz s-a observat, că VFF-18 se leagă mult mai bine de peptidă decât ceilalți anticorpi folosiți. (C): pentru o evaluare cantitativă s-a repetat acest experiment cu diferite concentrații de anticorpi purificați și aici se dovedește că VFF-18 are o afinitate de legătură superioară față de alți anticorpi. 260 265

- fig.4, legarea anticorpilor marcați radioactiv la celule tumorale. Cei trei anticorpi VFF-7 (anti-v6) VFF-8 (anti-v5) și VFF-18 (anti-v6) s-au marcat radioactiv cu N-succinil/2,3³H/ proponiat și s-au folosit pentru teste de legătură la diferite linii de celule tumorale. În acest caz s-au utilizat următoarele linii celulare: CHO-CD44var: linie de celule recombinante de hârciog (Chinese Hamster Ovary), variantele umane CD44 (Exon v3-v10) exprimate la suprafață; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205: linii de carcinom de colon umane; A431: linie de carcinom epitelial în plăci uman. Se dovedește legătura specifică a anticorpilor la diferitele linii celulare. Pe când legătura anticorpilor specifici v6 VFF-7 și VFF-18 la liniile de celule recombinante CHO-CD44 var se află în aceeași ordine de mărime, anticorpii la liniile de celule tumorale arată o comporare de legare foarte diferită. În unele cazuri se observă numai VFF-18 și în măsură mai mică legătura VFF-7 (HT-29, CaCo, COLO 205), la alte linii de celule VFF-18 leagă mult mai bine decât VFF-7. 270 275 280

- fig.5, demonstrarea variantelor de CD44 solubile, care conțin Exon v6 în serul normal uman. Într-un ELISA-Sandwich s-au folosit cei trei anticorpi v6 specifici VFF-4, VFF-7 resp. VFF-18 ca anticorpi de acoperire sub formă de strat. În toate cele trei cazuri s-a utilizat ca anticorp de demonstrare un anticorp CD44 std-specific conjugat cu peroxidază (BU-52, std = standard). În aceste teste se arată semnalul a două seruri normale umane la diferite diluări în aceste teste (A) și (B). În ambele cazuri se observă un semnal mult mai intens cu VFF-18 decât cu ceilalți doi anticorpi. 285

- fig.6, valori de ser ale variantelor CD44 conținând v6. Cu două ELISA diferite s-a determinat conținutul în CD44 var în seruri de la 6 donatori sănătoși. Într-un test s-a utilizat VFF-7 în celălalt VFF-18 ca anticorp aplicat în strat; ambii anticorpi recunosc Exon v6. Ca preparat de comparație a folosit în ambele cazuri o variantă CD44 recombinantă obținută în celule CHO (Exon v3-v10). VFF-18-ELISA arată în medie valori de 3,5 ori mai ridicate decât VFF-7-ELISA. Aceasta înseamnă că CD44 var solubil existent în ser se recunoaște mai bine de către VFF-18 decât de către VFF-7. 290

295 **Exemplul 1 . Obținerea anticorpilor monoclonali VFF-18***Clonarea proteinelor de fuziune pGEX*

Întreaga regiune variantă a tipului HPKII de CD44v (Hofmann și colab., 1991) s-a amplificat din cheratinocite umane cADN prin reacție în lanț a polimerazei (PCR). Cei doi PCR-primeri 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAATG-3', pozițiile 25-52 și 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', pozițiile 1013-984 ale regiunii variante LCC97, așa cum se descrie de către Hofmann și colab., au conținut un loc de recunoaștere EcoRI, care a fost folosit, pentru a clona produsul PCR direct în vectorul pGEX-2T (Smith D.B., Johnson K.S. *single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene* 67: 31-40 (1988). Constructul rezultat (pGEX CD44v HPKII, v3-v107 codifică pentru o proteină de fuziune de circa 70 kD, constând din Glutathion-S-transferază de Schistosoma japonicum și din Exoni v3-v10 de CD44 umani (fig.1; Heider K-H, Hofmann M., Horst E., van den Berg F., Ponta H., Herrlich P. And Pals S.T. *A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J. Cell Biol.* 120-233 (1993a). Proteina de fuziune a fost exprimată în *E.coli* și apoi s-a purificat prin afinitate peste Glutathion-Agaroză (Smith și colab., 1988).

Imunizare și sitare

Șoareci femel Balb/c au fost imunizate intraperitoneal cu proteină de fuziune purificată prin afinitate după schema următoare:

- | | | |
|-----|-------------------------|--|
| 315 | 1-a imunizare: | 90 µg proteină de fuziune în substanță auxiliară |
| | Freund | completă |
| | 2-a și a 3-a imunizare: | 50 µg proteină de fuziune în substanță auxiliară |
| | Freund | incompletă |

Imunizările au avut loc în intervale de câte 4 săptămâni. 14 zile după ultima imunizare animalele au fost imunizate încă 3 zile consecutiv cu câte 10 µg proteină de fuziune în PBS. În ziua următoare, celule de splină ale unui animal s-au fuzionat cu un titru ridicat de anticorp cu P3.X63-Ag8.653-celule de mielom de șoarece cu ajutorul polietilenglicolului 4000. Celulele de Hybridom s-au selecționat apoi în plăci de microtitru în mediu HAT (Köhler și Milstein, 1975; Kearney și colab., 1979).

325 Determinarea titrului de anticorp în ser respectiv sitarea supernatanților de Hybridom s-au realizat cu ajutorul unui ELISAs. La acest test plăcile de microtitrare s-au acoperit mai întâi cu proteină de fuziune (GST-CD44v3-10) sau numai cu Glutathion-S-transferază. Apoi s-a incubat cu diluări repetate de probe de ser respectiv cu supernatanți de Hybridom și s-au detectat anticorpii specifici cu anticorpi conjugați cu peroxidază împotriva imunoglobinei de șoarece. Hybridomii, care au reacționat numai cu Glutathion-S-transferază, au fost aruncați. Anticorpii rămași au fost caracterizați mai întâi într-un ELISA cu proteine de fuziune specifice pentru domeniile respective (Exon v3, Exon v5 + v6, Exon v6 + v7, Exon v8 - v10) (Koopman și colab., 1993). Reactivitatea lor imunhistochimică a fost testată la tăieturi de piele umană. Anticorpul VFF-18 a fost identificat prin legare la pepdita sintetică Hul (QWFGN RWHEG YRQT). Secvența din Hul este un fragment al CD44-Exonului v6.

Exemplul 2. Legarea anticorpilor CD44v6 specifici la peptide sintetice

Legarea anticorpilor CD44v6 specifici la peptide sintetice a fost determinată într-un test ELISA

Soluții:

- | | |
|-----|---|
| 340 | Tampon de acoperire: carbonat de sodiu 0,05 M, pH=9,6 |
| | Tampon de testare: PBS (Phosphat buffered saline = soluție de sare tamponată cu fosfat) |
| | 0,5% BSA (albumină de ser de vită) |
| | 0,05% Tween 20 |

RO 118753 B1

Soluție de substrat Fa. Kierkagaard & Perry laboratories, Gaithersburg MD, SUA; 345
TMB substrat de peroxidază: soluție de peroxidază B (H₂O₂) 1 :1

Peptidele (50 µg/ml în tamponul de acoperire) s-au imobilizat pe NUNC maxisorb-
imunoplăci (1.1ASML) sau Acti-A-plăci ale Fa. Bio Products (anticorpi VFF) la 4°C peste
noapte. La Acti-A-plăci peptida se leagă covalent de placă. Apoi, s-a spălat cu PBS/0,05%
Tween, locurile de adsorbție libere s-au blocat la suprafața plăcilor cu tampon de testare (o 350
oră la temperatura camerei) și s-au spălat încă odată cu PBS/0,05 % Tween 20. Acti-A-
plăcile s-au redus după blocare cu 10 mM borhidrură de sodiu în 20 mM carbonat acid de
sodiu, pH= 9,0 (s-au agitat la temperatura camerei o oră) și apoi s-au spălat de trei ori cu
PBS/0,05 % Tween. Apoi, supranatanții de Hybridom, respectiv soluțiile de anticorpi în
tampon de testare în concentrații între 0,02 și 10,0 µg/ml s-au pus în vase și s-au incubat 355
două ore la temperatura camerei într-un dispozitiv de agitare a plăcilor. După aceasta au
urmat trei trepte de spălare cu PBS/0,05 % Tween 20. Apoi, s-au adăugat 100 µm/vas
anticorpi IgG-anti-șoarece conjugați cu peroxidază de hrean într-o diluție adecvată în tampon
de testare. După o incubare de două ore la temperatura camerei s-a spălat suprafața dispo-
zitivului de agitare a plăcilor de trei ori cu PBS/0,05 % Tween 20 și s-a colorat cu soluție de 360
substrat. După 10-15 min dezvoltarea s-a stopat cu acid sulfuric 2M, și absorbția s-a
măsurat la 450 nm (referință 690 nm) la fotometru.

Într-o primă experimentare s-a demonstrat legătura anticorpului 1.1AS;L specific
pentru șobolani-CD44v6 la peptida Ral (KWFEN EWQGK NPPT) (Tabelul 1, fig.3 (A)).

Tabelul 1

1.1 ASML µg/ml	Absorbția
10,0	1,652
5,00	1,702
2,50	1,658
1,25	1,595
0,63	1,502
0,31	1,211
0,16	0,971
0,08	0,686
0,04	0,458
0,02	0,270

Într-o altă încercare s-a sintetizat o peptidă omologă lui Ral din secvența umană
CD44v6 (Hul, QWFGN RWHEG YRQT). S-au legat diferiți anticorpi anti-umani CD44v6. la
Hul. În acest caz se dovedește, că VFF-18 prezintă o afinitate de legare surprinzător mai
ridică decât toți anticorpulii folosiți (tabelul 2, fig.3 (B)). 380

Tabelul 2

Anticorp	Absorbția
VFF-2	0,067
VFF-4	1,333
VFF-7	0,199
VFF-18	2,386

Pentru evaluarea cantitativă s-au legat în afară de acești anticorpi purificați anti-uman-CD44v6 în diferite concentrații la peptida Hul și în acest caz se arată afinitatea de legătură mai bună, în mod clar, în comparație cu ceilalți anticorpi (tabelul 3, fig.3 (C)).

Tabelul 3

μg/ml anticorp	VFF-4	VFF-7	VFF-18
10,000	1,225	0,247	2,320
3,333	1,404	0,226	2,550
1,111	0,853	0,094	2,483
0,370	0,336	0,054	2,426
0,123	0,163	0,028	1,354
0,041	0,086	0,025	0,615
0,014	0,048	0,021	0,266
0,005	0,036	0,031	0,095
0,002	0,021	0,021	0,061

Exemplul 3. Legarea anticorpilor marcați specifici CD44v6 la linii de celule tumorale
Marcarea radioactivă a anticorpilor

1mCi N-succinimidil-/2,3-³H/-propionat (³H/-NSP, Amersham 1 mCi/ml) s-au evaporat într-un capilar de probe siliconizat la 0°C în vid cu jet de apă până aproape la sec. S-au adăugat 15 μg de anticorpi (1 mg/ml în PBS, pH=7,4) și s-au incubat 48 h la 4°C. Apoi, s-au captat ³H/-NSP prin reacție cu 30 μl glicină 1M în PBS (20 min la temperatura camerei). Separarea anticorpului marcat de ³H/-glicină a avut loc pe o coloană Sephadex-G-25-M (volumul coloanei 15 ml), utilizându-se ca tampon curgător PBS/0,5% BSA. Anticorpul marcat ³H/ apare în volumul de evacuare. Cantitatea de anticorp a fost determinată într-un test ELISA pentru detectarea imunoglobulinei de șoarece și s-a calculat activitatea specifică.

Legarea anticorpilor radiomarcați la celule tumorale

Cei trei anticorpi VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) și VFF-18 (anti-v6) au fost marcați radioactiv cu N-succinimidil-/2,3-³H/-proponiat și s-au folosit pentru testul de legare la diferite linii de celule tumorale. Următoarele linii de celule au fost utilizate în acest caz: CHO-CD44 var: linia de celule de hârciog recombinantă (Chinese Hamster Ovary), variantele umane CD44 (Exons v3-v10) exprimate la suprafață; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCO, COLO 205: linii de carcinom de colon umane; A431: linia de carcinom de epitelu în plăci umane.

Celulele au fost puse în plăci pentru culturi de țesuturi cu 12 găuri, au fost incubate peste noapte la 37°C în incubator cu CO₂, apoi s-au spălat odată cu PBS și s-au fixat cu etanol (1 min la temperatura camerei). Apoi, s-au spălat odată cu mediu de cultură (ser fetal de vițel RPMI 1640/10%) și s-a legat anticorpul radioactiv (250000 dpm/vas în mediu de cultură). După o incubare de 25 h la temperatura camerei pe dispozitivul de scuturare cu plăci s-a spălat de trei ori cu PBS/0,5 % BSA, celulele s-au solubilizat cu 0,1 M NaOH/1% Triton X-100 și radioactivitatea s-a măsurat în contorul de scintilație. Legarea nespecifică a fost determinată în prezența unui exces de 100 de ori de anticorpi nemarcați. După determinarea activității specifice a anticorpilor, cantitatea de anticorpi legați poate fi exprimată în fmol.

RO 118753 B1

Tabelul 4 și fig.4 arată legarea specifică a anticorpilor la diferite linii de celule. Pe când legarea anticorpilor VFF-7 specifică pentru v6 și VFF-18 la linia de celule recombinantă CHO-CD44 var a fost aproape identică, anticorpii arată la legătura cu liniile de celule tumorale comportamente diferite de legătură. În unele cazuri se observă numai o legătură cu VFF-18 și în măsură redusă o legătură cu VFF-8 (HT-29, CACo, COLO 205), la celelalte linii de celule VFF-18 se leagă mult mai bine decât VFF-7.

Tabelul 4

Linia de celule	VFF-7 fmol	VFF-8 fmol	VFF-18 fmol
CHO CD44var	33,50	68,42	46,52
HCT-116	1,44	11,08	20,22
CX-1	0,19	2,20	9,48
HT-29	0,00	2,60	26,07
CaCo	0,03	2,81	12,57
COLO 205	0,00	0,32	2,88
A431	8,19	42,32	38,37

Exemplul 4. ELISA pentru determinarea CD44 v6 solubil în ser

Soluții:

Tampon de acoperire: 0,05 M carbonat de sodiu pH=9,6
PBS (soluție sărată tamponată cu fosfat)
0,5% BSA (albumină de ser de vită)
0,05% Tween 20

Diluant de probă: Fa.Bender MedSystem, Viena, Austria

Soluție de substrat: Fa. Kierkegaard & Perry laboratories,
GAITHESSBURG MD, SUA; TMB substrat de
peroxidază: soluție de peroxidază B (H₂O₂)1:1

Plăci de microtitru (imunoplață Nunc MaxiSorp F96) s-au acoperit cu 5 μg/ml dintr-un anticorp specific pentru CD44v6 (incubarea la 4°C peste noapte). Apoi, s-a spălat cu PBS/0,05 % Tween, locurile de adsorbție libere s-au blocat la suprafața plăcilor cu tampon de testare (o oră la temperatura camerei) și s-a spălat încă odată cu PBS/0,05% Tween 20. Probele de ser au fost apoi prediluate cu Sample Diluent (=diluant de probă) cel puțin 1:5 și s-au diluat mai departe în diluări în serii 1:2 în placă în Sample Diluent. Apoi, s-au adăugat 50 μl/vas anticorpi anti-CD44std conjugați cu peroxidază de hrean (clon BU-52, The Binding Dite, Birmingham) într-o diluție adecvată (1:3000 - 1:10000) în tamponul de testare. După incubare de trei ore la temperatura camerei pe dispozitivul de agitare cu plăci s-a spălat de trei ori cu PBS/0,05% Tween 20 și s-a colorat cu soluție de substrat. După o dezvoltare de 10-15 min s-a stopat cu acid sulfuric, și absorbția s-a măsurat la 450 nm (referință 690 nm) la fotometru.

Pentru cuantificare s-a efectuat o diluare în serie în tampon de testare a unui preparat CD44-standard în paralel cu probele de ser. Acest preparat s-a purificat dintr-un supernatant de celule de hârciog recombinante (CHO), care exprimă CD44v3-v10 solubil CD44v3-v10 se referă la o variantă umană CD44, care conține prin Exoni v3 până la v10 secvențe codificate de peptidă.

475

Tabelul 5 și fig.5 arată dovedirea de variante solubile de CD44, care conțin Exon v6, în ser normal uman. Într-un sandwich ELISA s-au introdus cei trei anticorpi specifici la v6, VFF-4, VFF-7 resp. VFF-18 ca anticorpi de acoperire. În toate cele trei cazuri s-a utilizat drept anticorp de demonstrare un anticorp specific la CD44std 8BU-52 std = standard) conjugat cu peroxidază. Se arată semnalul a două seruri diferite umane normale la diferite diluări în aceste testări. În ambele cazuri ((A) și (B)) se observă cu VFF-18 un semnal mult mai puternic decât cu ceilalți doi anticorpi.

480

Tabelul 5A

Serul 1

Diluția	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	0,406	0,417	3,143
1:10	0,378	0,289	3,055
1:20	0,296	0,179	2,630
1:40	0,207	0,072	1,778
1:80	0,109	0,062	1,084
1:160	0,050	0,030	0,594
1:320	0,026	0,008	0,318
1:640	0,012	0,007	0,159

485

490

Tabelul 5B

Serul 2

Diluția	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	1,690	1,280	3,290
1:10	1,756	1,185	3,321
1:20	1,564	0,857	3,163
1:40	1,213	0,468	3,050
1:80	0,699	0,208	2,537
1:160	0,336	0,061	1,666
1:320	0,138	0,014	0,988
1:640	0,054	0,018	0,546

495

500

505

Tabelul 6 și fig.6 arată variante de CD44 care conțin v6. Cu două ELISA diferite s-a determinat conținutul în CD44 var solubil în serurile a 6 donatori sănătoși. Într-un test s-a utilizat ca anticorp de acoperire VFF-7, în celălalt VFF-18; ambii anticorpi recunosc pe Exon v6. Ca preparat de comparație s-a folosit în ambele cazuri o variantă CD44 (Exon v3-v10) solubilă recombinantă obținută în celule CHO. VFF-18-ELISA arată în medie valori de 3,5 ori mai mari decât VFF-7-ELISA. Aceasta înseamnă că CD44 var solubil care apare în ser se recunoaște de către VFF-18 în comparație cu proteina recombinantă mai bine decât de către VFF-7.

510

Tabelul 6

Donator	VFF-7 ng/ml	VFF-18 ng/ml	VFF-18/VFF-7
1	18,2	75,9	4,17
2	32,1	85,5	2,66
3	22,4	87,6	3,91
4	27,7	91,6	3,31
5	26,8	98,3	3,67
6	95,4	3,32	3,48
Valoarea medie			3,53
SD			0,52
CV%			14,9%

PROTOCOL DE SECVENȚE

(1) DATE GENERALE:

(I) TITULAR:

(A) NUMELE: Boehringer Ingelheim International GMBH

(B) STRADA: Binger Str.

(C) LOCALITATEA: Ingelheim

(E) ȚARA: Germania

(F) COD POȘTAL: 55216

(G) TELEFON: 06132-772770

(H) TELEFAX: 06132-774377

(A) NUMELE: Dr. Guenther Adolf

(B) STRADA: Stiftgasse 15-17/10

(C) LOCALITATEA: Viena

(E) AUSTRIA

(F) CODUL POȘTAL: A-1070

(A) NUMELE: Dr. Erik Patzelt

(B) STRADA: Hans-Buchmueller-Gasse 8

(C) LOCALITATEA: Punksdorf

(E) ȚARA: Austria

(F) COD POȘTAL: A-3002

(ii) DENUMIREA INVENȚIEI: Anticorp monoclonal împotriva CD44v6

(iii) NUMĂRUL DE SECVENȚE: 6

(iv) CAPACITATEA DE CITIRE LA COMPUTER

(A) PURTĂTOR DE DATE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) SISTEM DE EXPLOATARE: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAM DE AUTOMIZARE (SOFTWARE):

(2) INDICAȚII LA SEQ ID NO: 1:

(I) CARACTERISTICA SECVENTEI:

560

(A) LUNGIME: 27 perechi de baze

(B) FELUL: Nucleotidă

(C) FORMA LINIEI: Linie individuală

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) FELUL MOLECULEI: Acid nucleic divers

565

(A) DESCRIERE: /desc="PCR Primer"

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO: 1:

CAGGCTGGGA GCCAAATGAA GAAAATG

(2) INDICAȚII LA SEQ ID NO: 2:

(I) CARACTERISTICA SECVENȚEI:

570

(A) LUNGIME: 30 perechi de baze

(B) FELUL: Nucleotidă

(C) FORMA LINIEI: Linie individuală

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) FELUL MOLECULEI: acid nucleic divers

575

(A) DESCRIERE: /desc = "PCR Primer"

(xi) DESCRIEREA SECVENTEI: SEQ ID NO: 2:

TGATAAGGAA CGATTGACAT TAGAGTTGGA

(2) INDICAȚII LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTICA SECVENȚEI:

580

(A) LUNGIME: 14 amino acizi

(B) FELUL: Amino acid

(C) FORMA LINIEI: Linie individuală

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) FELUL MOLECULEI: Peptidă

585

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO: 3

Lys Trp Phe Glu Asn Glu Trp Gln Gly Lys Asn Pro Pro Thr

1

5

10

(2) INDICAȚII LA SEQ ID NO: 4: (I) și (ii) ca mai sus la No 3; (xi):

Gln Trp Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Cln Thr

590

1

5

10

(2) INDICAȚII LA SEQ ID NO: 5:

(I) CARACTERISTICA FRECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 42 Amino acizi

(B) FELUL: Amino acid

595

(C) FORMA LINIEI: Linie individuală

(ii) FELUL MOLECULEI: Peptidă

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO: 5:

Trp Ala Asp Pro Asn Ser Thr Thr Glu Glu Ala Ala Thr Gln Lys Glu

1

5

10

15

600

Lys Trp Phe Glu Asn Glu Trp Cln Gly Lys Asn Pro Pro Thr Pro Ser

20

25

30

Glu Asp Ser His Val Thr Glu Gly Thr Thr

35

40

(2) INDICAȚII LA SEQ ID NO: 6:

(I) CARACTERISTICA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 43 de amino acizi

(B) FELUL: Amino acid

(C) FORMA LINIEI: Linie individuală

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) FELUL MOLECULEI: Peptidă

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO: 6:

Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu

1 5 10 15

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg

20 25 30

Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala Ala

35 40

Revendicări

1. Anticorp împotriva unui epitop cuprins în secvența de aminoacizi codificată de exonul 6 variabil al genei CD44, **caracterizat prin aceea că**, el este anticorpul VFF-18 produs de către linia celulară hibridom cu numărul de depozitare DSM ACC2174.

2. Linie celulară hibridom cu numărul de depozitare DSM ACC2174.

3. Derivat de anticorp care se poate obține prin modificarea chimică sau enzimatică a unui anticorp, conform revendicării 1.

4. Derivat de anticorp, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, el este un fragment al unui anticorp, conform revendicării 1.

5. Derivat de anticorp, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, el este un fragment Fab sau un fragment F (ab')₂.

6. Derivat de anticorp, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, anticorpul este legat de o altă moleculă.

7. Derivat de anticorp, conform revendicării 6, **caracterizat prin aceea că**, cealaltă moleculă este o polipeptidă.

8. Derivat de anticorp, conform cu oricare dintre revendicările 3 până la 5, **caracterizat prin aceea că**, el este legat de un izotop radioactiv.

9. Derivat de anticorp care recunoaște același epitop ca și anticorpul conform revendicării 1.

10. Anticorp recombinant cu idiotipul unui anticorp, conform revendicării 1.

11. Anticorp recombinant, conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că**, el este un derivat de anticorp himeric, umanizat, sau cu un singur lanț sau este un derivat de anticorp obținut prin amestecarea de lanțuri (chain shuffling).

12. Anticorp recombinant, conform revendicării 9 sau 10, **caracterizat prin aceea că**, el este legat de o altă moleculă sau de un izotop radioactiv.

13. Compoziție farmaceutică, **caracterizată prin aceea că** ea cuprinde ca ingredient activ un anticorp sau un derivat de anticorp conform cu oricare dintre revendicările 1 sau 3 până la 12.

14. Utilizarea unui anticorp sau a unei molecule de anticorp, conform uneia din revendicările 1 sau 3 până la 12 pentru metodele de diagnosticare în afara corpului uman sau animal.

15. Utilizarea, conform revendicării 14, **caracterizată prin aceea că** metoda este un imunotest cuplat cu o enzimă sau un radioimunotest.

16. Utilizarea, conform revendicării 14, **caracterizat prin aceea că** metoda este o metodă imunohistochimică.

655

17. Utilizarea unui anticorp sau a unei molecule de anticorp, conform uneia din revendicările 1 sau 3 până la 11 pentru prepararea unei substanțe pentru diagnosticarea *in vivo*.

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. biochim. Eremia Laura**

RO 118753 B1

(51) **Int.Cl.⁷ C 07 K 16/28;**
C 12 N 5/20; G 01 N 33/577;
A 61 K 39/395; A 61 K 49/00

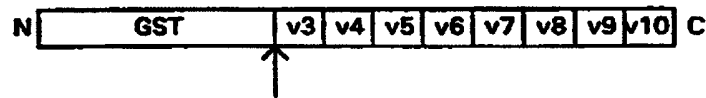


Fig. 1

Sobolan: * * * * * ** * * *

Om: WADPNSTTEEAATQKEKNFENWOGKNPPTPSDSHVTEGT T
 QATPSSTTETATQKEOWFGNHWEGYRQTTPREDSHSTTGTA

Peptid Ral bzw. Hu1

Fig. 2

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 16/28;
C 12 N 5/20; G 01 N 33/577;
A 61 K 39/395; A 61 K 49/00

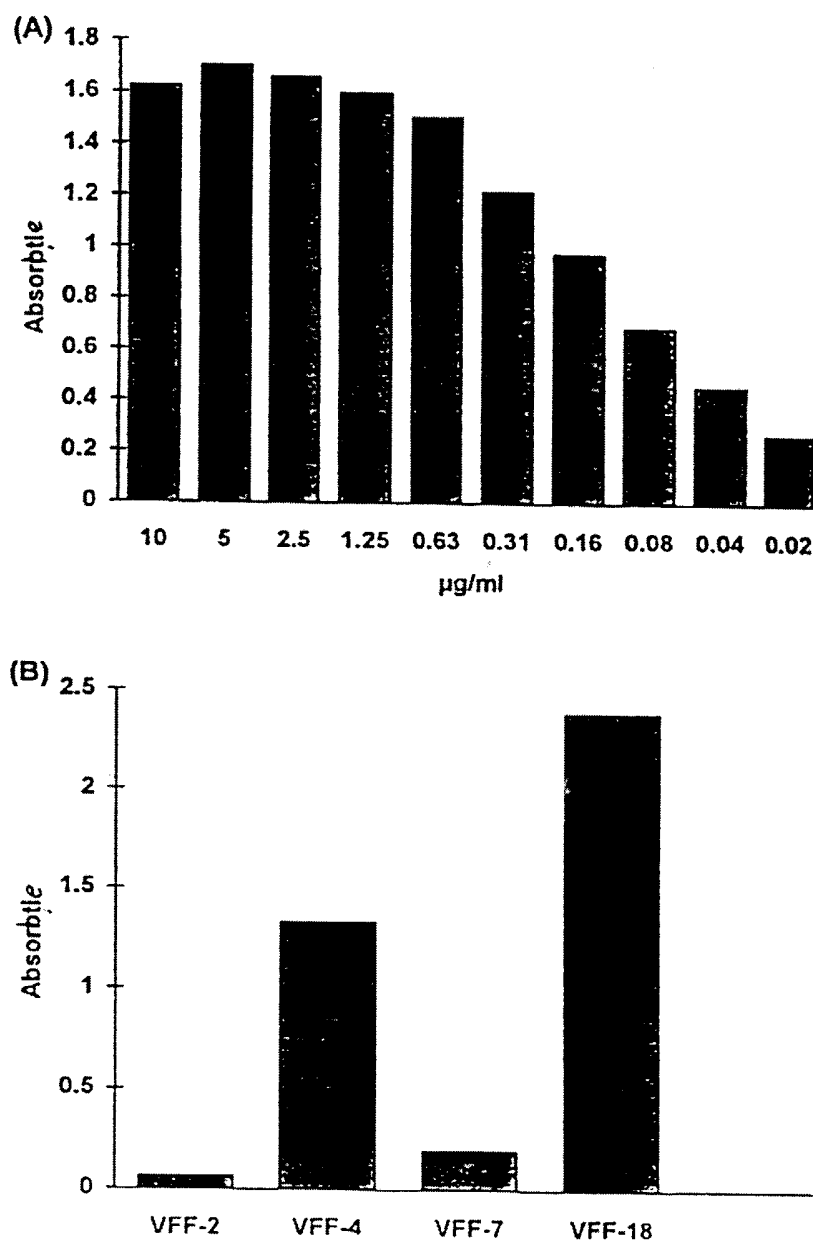


Fig. 3

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 16/28;
C 12 N 5/20; G 01 N 33/577;
A 61 K 39/395; A 61 K 49/00

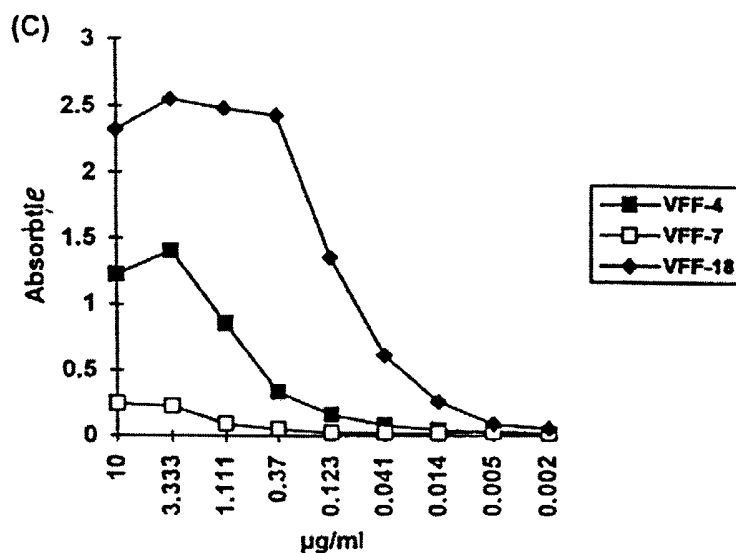


Fig. 3

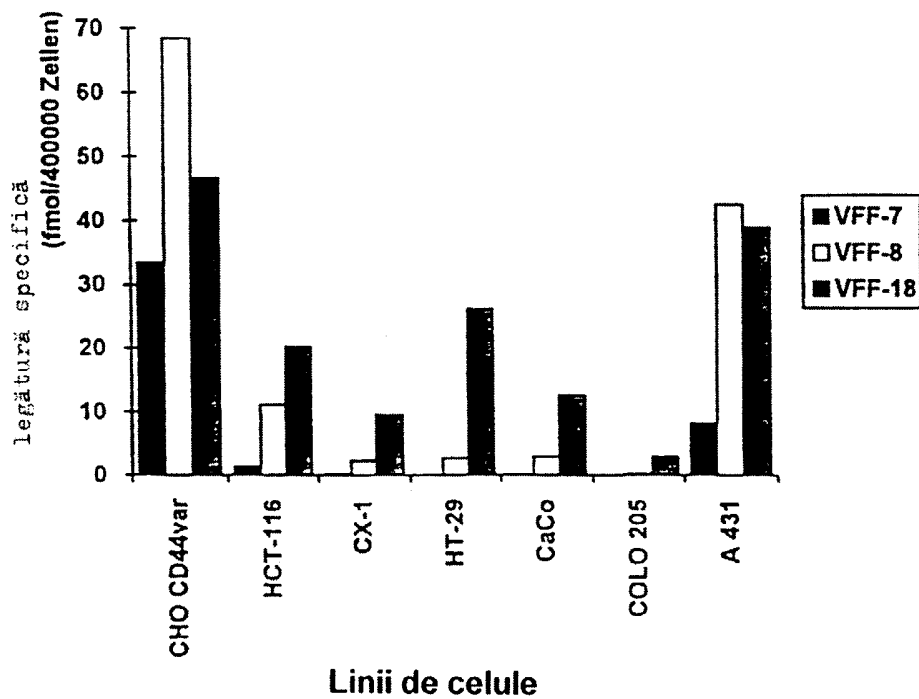


Fig. 4

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 16/28;
C 12 N 5/20; G 01 N 33/577;
A 61 K 39/395; A 61 K 49/00

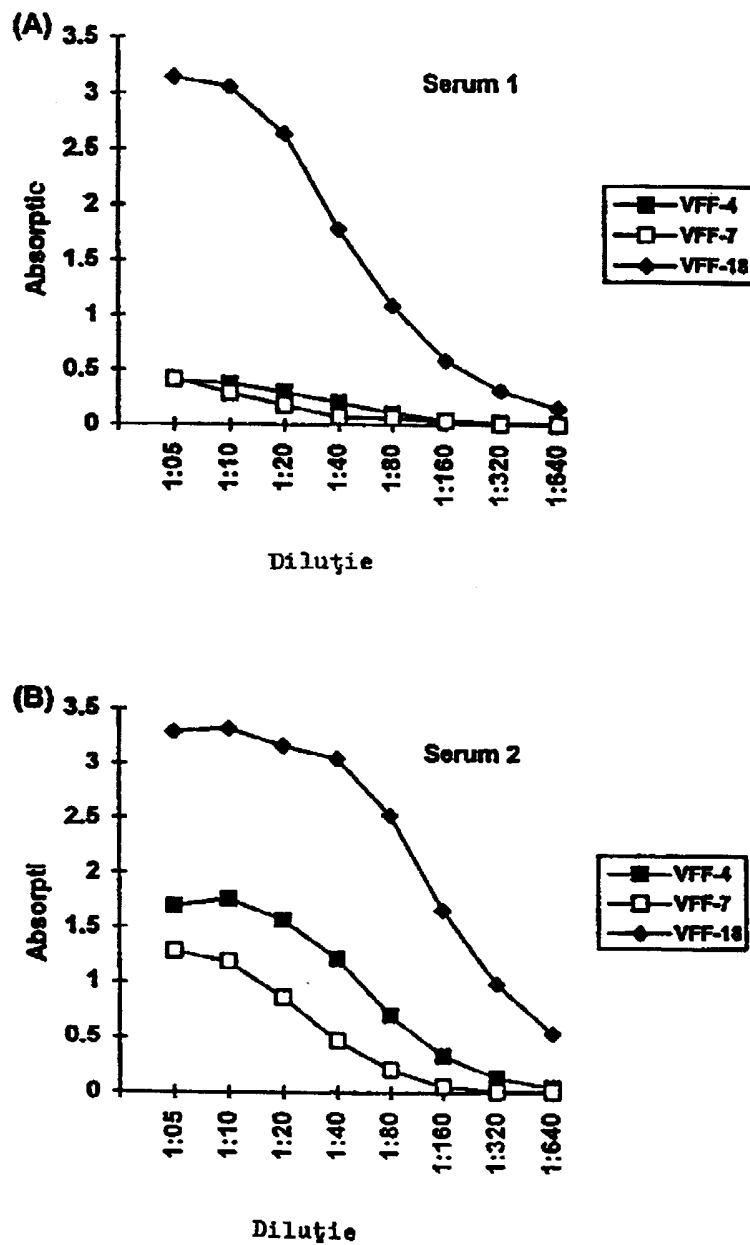


Fig. 5

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 16/28;
C 12 N 5/20; G 01 N 33/577;
A 61 K 39/395; A 61 K 49/00

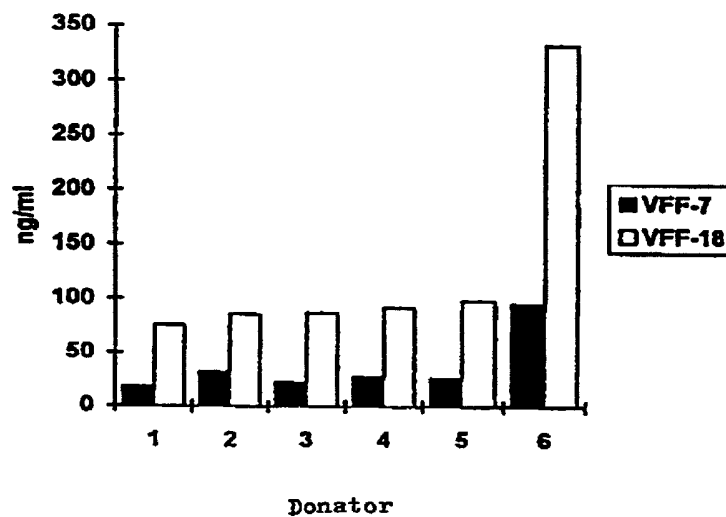


Fig. 6