



(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: 148283 | (61) Perfecționare la brevet:
Nr. |
| (22) Data de depozit: 21.12.1990 | (62) Divizată din cererea:
Nr. |
| (30) Prioritate: 21.12.1989 GB 8928874.0; | (86) Cerere internațională PCT:
Nr. GB 90 / 02015 21.12.1990 |
| (41) Data publicării cererii:
BOPI nr. | (87) Publicare internațională:
Nr. WO 91/09966 11.07.1991 |
| (42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.09.1999 BOPI nr. 9/1999 | (56) Documente din stadiul tehnicii:
PCT/GB85/00392; EP-A-0239400 |
| (45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr. | |

- | | |
|-------------------|--|
| (71) Solicitant: | ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION, RARITAN, US; |
| (73) Titular: | ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION, RARITAN, US; |
| (72) Inventatori: | JOLLIFFE LINDA KAY, SOMERVILLE, US; ZIVIN ROBERT ALLAN, LAWRENCEVILLE, US; PULITO VIRGINIA LEE, FLEMINGTON, US; ADAIR JOHN ROBERT, HIGH WYCOMBE, BUCKINGHAMSHIRE, GB; ATHWAL DILJEET SINGH, LONDRA, GB; |
| (74) Mandatar: | ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI |

(54) **MOLECULĂ ANTICORP CAPABILĂ SĂ SE LEGE LA ANTIGENA CD4, SECVENȚĂ DE NUCLEOTIDE, PROCEDEU DE PREPARARE ȘI METODĂ DE TRATAMENT**

(57) **Rezumat:** Molecula anticorp, capabilă să se lege la antigena CD₄, conform invenției, constă în aceea că, în domeniul variabil al numitei catene lungi compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 23, 24, 26 până la 35, 49 până la 65 și 95 până la 102, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un al doilea anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor), așa cum se arată în fig.3, iar în domeniul variabil al numitei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant dintr-un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor), așa cum se arată în fig.4. Secvența de nucleotide codifică

o catenă de anticorp compozită, așa cum aceasta este definită mai înainte și este prezentată în fig.1 și 2. Procedeul pentru prepararea moleculei anticorp, capabile să se lege la antigena CD₄, în conformitate cu prezenta invenție, cuprinde: a) furnizarea unei prime secvențe ADN, care codifică o catenă lungă compozită, așa cum aceasta este definită mai sus sau o catenă scurtă compozită, de asemenea așa cum aceasta este definită mai sus, sub controlul elementelor corespunzătoare din partea superioară și inferioară; b) transformarea celulei gazdă cu prima secvență ADN; și c) cultivarea celulei gazdă transformate astfel încât să se producă o moleculă anticorp, conform cu cele prezentate mai sus.

Revendicări: 28
Figuri: 19

RO 114980 B1



Prezenta invenție se referă la o moleculă de anticorp, capabilă să se lege la antigena CD4, la secvența de nucleotide care o codifică precum și la procedeul de preparare și metoda de tratament cu această moleculă de anticorp.

În prezenta descriere, termenul de "Ig" este utilizat pentru imunoglobulinele naturale.

Imunoglobulinele naturale sunt cunoscute de mai mulți ani și cuprind o moleculă generală în formă de Y având o porțiune de legătură antigenică către capătul fiecărui braț superior. Partea rămasă din structură, și în special, tulpina de la Y, mediază de exemplu Fab, (Fab')₂, Fv și Fc ca fragmente care pot fi derivate prin clivaj enzimatic.

Igs naturale cuprind catene lungi și catene scurte, capetele N-terminale ale fiecărei perechi de catene lungi și scurte fiind asociate și formând porțiunile de legătură antigenică. Capetele terminale C ale catenelor lungi sunt asociate pentru a forma porțiunea Fc.

Denumirile de reziduuri pentru catenele lungi și scurte, date în prezenta descriere de invenție și revendicări, sunt în conformitate cu schema de numerotare Kabat. Astfel, denumirile de reziduuri nu corespund totdeauna direct cu numerotarea lineară a reziduurilor de aminoacizi. Secvența actuală lineară de aminoacizi poate conține reziduuri mai puține sau reziduuri de aminoacizi adiționale față de stricta numerotare Kabat, arătând astfel că acestea au fost înserate sau distruse. Aceste inserții sau distrugerii pot fi prezente oriunde în aceste catene. Numerotarea corectă a reziduurilor poate fi determinată pentru Ig dat prin aliniere la regiunile de homologie ale secvenței Ig cu secvența de numerotare standard Kabat.

Aceasta s-a determinat dintr-un studiu al secvențelor de aminoacizi al unui mare număr de Igs ca domenii variabile care sunt localizate la capetele N-terminale ale catenelor pentru ambele catene lungi și scurte conținând trei regiuni în care secvența de aminoacid este hipervariabilă. Aceste regiuni hipervariabile sunt flancate pe fiecare parte prin regiuni care variază mai puțin substanțial în secvență. S-a ajuns la concluzia că regiunile hipervariabile sunt cuprinse în legătura antigen.

Mult mai recent, studiile structurale utilizând raze X cristalografice și modele moleculare au definit trei regiuni în domenii variabile pentru fiecare din aceste catene lungi și scurte, care par a fi incluse în legătura antigenică. Aceste trei regiuni se referă în general la regiuni de determinare a complementarității (CDRs). CDRs sunt definite la un loc prin regiunile rămase la domeniile variabile pentru a forma cel puțin partea de legătură antigenică. Aceste regiuni rămase sunt în general referitoare la regiunile cadru.

Este de apreciat că unii lucrători în domeniu, și în special Kabat, s-au referit la regiunile hipervariabile ca fiind CDRs. Pentru scopul clarității, termenul de "regiune hipervariabilă" se utilizează numai pentru a descrie regiunile de legătură antigenică determinate prin analiza structurală.

O comparație a regiunilor hipervariabile, așa cum s-a determinat prin analiza secvenței și CDRs și așa cum s-a determinat prin studii structurale, arată că există o oarecare corespondență, dar nu completă, între aceste regiuni.

În prezenta descriere de invenție termenul de "anticorp" se utilizează pentru a descrie Igs sau fragmentele acestuia, a monomerilor cu catene lungi sau scurte sau dimerii și anticorpii cu catenă simplă, cum ar fi de exemplu o simplă catenă Pvs în care catena lungă și scurtă din domeniile variabile sunt legate prin linkeri de peptide dacă

tehnologia ADN recombinat produs sau natural sau altfel, prevede ca anticorpul să includă cel puțin o parte de legătură antigenică. Partea rămasă din anticorp nu este necesar să cuprindă numai secvențele proteine derivate de la Ig. De exemplu, o genă poate fi construită din secvența de ADN codificată parțial la catena Ig umană este fuzionată la secvența de ADN codificată la secvența de aminoacid a polipeptidei efectoare sau moleculei reportoare. Astfel, "anticorpul" cuprinde anticorpii hibridi (vezi mai jos).

50

Prescurtarea "Mab" este utilizată pentru a indica anticorpul monoclonal așa cum este produs prin hibridoma sau prin linia celulară derivată.

Termenul de "anticorp recombinant" este utilizat pentru a descrie un anticorp produs printr-un procedeu, incluzând utilizarea tehnologiei recombinante a ADN.

55

Termenul de "anticorp chimeric" este utilizat pentru a descrie un anticorp în care domeniile variabile, ca un întreg, sunt derivate din anticorp, de la specii de mamifere și au fost fuzionate în cel puțin un domeniu constant din anticorp din diferite specii de mamifere.

Termenul de "anticorp hibrid" este utilizat pentru a descrie o proteină care cuprinde cel puțin o porțiune de legătură antigenică a Ig atașată la polipeptida de legătură, la cel puțin o parte din proteină. Este de apreciat că anumite persoane care lucrează în domeniu pot utiliza termenul de "chimeric" pentru a descrie astfel de construcții, dar în prezenta specificație, astfel de construcții se referă la anticorpi hibridi, și termenul de anticorpi chimerici este utilizat în același sens cum s-a definit mai sus.

60

65

Termenul de "anticorp grefat pe CDR" este utilizat pentru a descrie un anticorp având cel puțin unul, doi sau trei din CDRs într-unul sau în ambele domenii variabile derivate de la un anticorp din prima specie, părțile rămase derivate de la Ig ale anticorpului fiind derivate de la unul sau de la mai mulți anticorpi diferiți. Domeniile variabile pot fi realizate prin utilizarea unei tehnologii recombinante a ADN-ului sau prin sinteza de polipeptide.

70

Termenul de "vector de exprimare" include vectorii care sunt capabili de exprimare a secvențelor de ADN conținând în ei de exemplu secvențe codificate care sunt operabil unite la alte secvențe capabile de efectuare a exprimării acestora. Un element uzual, dar nu totdeauna necesar (de exemplu celulele de insecte) al unui vector de exprimare efectivă este un marker cu secvență codificată ca de exemplu o secvență codificată, o secvență de vector care rezultă într-o proprietate fenotipică (de exemplu rezistența la neomicină, rezistența la sulfoximina metioninică sau prototrofia triptofanului) a celulelor care conțin proteina, și permit acestor celule să fie real identificate. Pe scurt, termenul de "vector de exprimare" este dat ca definiție funcțională, și orice secvență de ADN este capabilă de efectuare a exprimării unui cod specificat conținut de ADN, astfel ca să fie aplicat la secvențe specifice. Astfel de vectori sunt frecvent, în formă de plasmide. O astfel de "plasmidă" și "vector de exprimare" sunt adesea utilizați interschimbabili. Totuși, invenția de față intenționează să includă astfel de forme de exprimare a vectorilor care servesc ca funcții echivalente și care pot, din timp în timp, să devină cunoscute în literatura de specialitate, incluzând retrovirusurile, în sistemele vitro și altele asemănătoare.

75

80

85

Așa cum s-a menționat mai înainte, secvențele de ADN vor fi exprimate în celule gazdă după ce secvențele au fost operabil unite la (de exemplu poziționate pentru a asigura funcționarea lor) secvența control de exprimare. Acești vectori de exprimare sunt

90

tipic replicabili în organismele gazdă, fie ca epizomi sau ca parte integrală a ADN-ului gazdă cromozomială.

Termenul de "celule gazdă recombinante" se referă la celulele care au fost transformate cu vectorii construiți, utilizându-se tehnici de recombinare a ADN-ului. Datorită acestei transformări, celula gazdă este capabilă de a produce produsul dorit în cantitățile utilizate, mai degrabă decât în cantități mai mici sau mai comune; în cantități mai mici decât cele detectabile sau comune, așa cum este de așteptat să se producă prin gazda netransformată.

În descrierea procedurii pentru izolarea anticorpilor din gazdele recombinante, termenul de "celulă" și "cultură de celulă" se utilizează interschimbabil pentru a arăta sursa de anticorpi mai ales dacă nu este clar specificat. Cu alte cuvinte, recuperarea unui anticorp din "celule" poate însemna fie prin îndepărtarea celulei întregi, fie izolarea din cultura celulară care conține atât mediul cât și celulele suspendate sau adițional, așa cum este posibil în cazul liniei celulare mieloma din cultura de ascite.

Igs naturali au fost utilizați în analiza de diagnoză și, până la o extindere mult mai limitată, în terapie. Cu toate acestea, astfel de utilizări, în special, au fost împiedicate de natura policlonală a Igs naturale. O fază semnificativă către realizarea potențialului Igs ca agenți terapeutici este descoperirea tehnicilor de preparare a MAbs de specificități definite. MAbs sunt în general produse prin fuziunile celulelor splenice de rozătoare cu celule mieloma de rozătoare, și astfel sunt în esență proteine de rozătoare. Totuși, există foarte puține referiri la producerea cu succes a MAbs umani. O serie de MAbs având specificități pentru antigeni pe limfocitele T și subseturile de limfocite T, se descrie în literatura de specialitate.

Deoarece mult mai convenabil pentru MAbs este ca să fie în întregime de origine de rozătoare, acestea sunt de natură antigenică la oameni și astfel se poate obține un răspuns imun nedorit, cum ar fi de exemplu un răspuns denumit HAMA (răspuns anticorp anti-șoarece uman. De aceea utilizarea MAbs de rozătoare ca agenți terapeutici la om este inherent limitată, prin faptul că subiectul uman poate determina un răspuns imunologic la MAb și acesta va fi, fie complet îndepărtat sau cel puțin redus ca efectivitate. Astfel, în practică, MAbs la origine de rozătoare nu se recomandă în general pentru utilizare la pacienți pentru mai mult decât unul sau câteva tratamente, ca un răspuns HAMA care se poate dezvolta, redând ineficacitatea MAb cât și ducând la creșterea unor reacții secundare nedorite.

Au fost făcute propuneri pentru redarea la oameni a MAbs mai puțin antigenic. Astfel de tehnici pot fi în general denumite "tehnici de umanizare". Aceste tehnici cuprind în general utilizarea tehnologiei recombinante a ADN-ului pentru a manipula secvențele de ADN, codificând catenele de polipeptide ale moleculei anticorp.

În anii recentți, avansurile în biologia moleculară este bazată pe producerea unei game largi de polipeptide heteroloage prin transformarea celulelor gazdă cu secvențe de ADN heteroloage care codifică pentru producerea produșilor doriți.

În literatura de specialitate se propune construirea unor vectori recombinanți de ADN cuprinzând o secvență de ADN care se codifică pentru domeniul variabil al catenei lungi sau scurte a Ig specifice pentru un ligand predeterminat. Secvența de ADN este prevăzută cu codoane de inițiere și terminație la cel puțin termenii de 5' și respectiv 3', dar se leagă de orice nucleotide codificate pentru aminoacizii superflu în domeniul variabil. Secvența ds a ADN-ului este utilizată pentru transformarea celulelor bacteriene.

Aplicarea nu contemplează variațiile de secvență a domeniului variabil.

Tot în literatura de specialitate se descrie clonizarea și exprimarea organismelor gazdă bacteriene a genelor pentru întreaga sau parțială catenă umană de polipeptidă cu catenă lungă IgE, dar aceasta nu contemplează variațiile în secvența polipeptidei.

140

Se propune utilizarea tehnicilor de ADN recombinant în celule bacteriene pentru a produce Igs care sunt analoage cu cele găsite în mod normal în sistemele vertebrale și care au avantaj în tehnicile de modificări ale genei propuse în prezenta descriere de invenție pentru construirea anticorpilor chimerici sau alte forme modificate de anticorpi.

Se crede că propunerile făcute mai sus prin, aplicație de tehnică genetică, nu conduc la exprimarea oricăror cantități semnificative de catene polipeptidice Ig și nici la producerea activității Ig, de asemenea nici la secreția și la asamblarea catenelor în anticorpii chimerici doriți.

145

Urgența recentă a acestor tehnici permite introducerea stabilă a genei Ig la ADN, în celulele de mamifere care deschide posibilitatea utilizării *in vitro* a mutagenezei și transfectarea ADN-ului la construcția de anticorpi recombinanți care posedă proprietăți noi.

150

Totuși, se cunoaște că funcția moleculei de anticorp este dependentă de structura sa tridimensională care în schimb este dependentă de secvența sa primară de aminoacid. Astfel, schimbând secvența de aminoacid a anticorpului poate afecta advers activitatea sa. Mai mult decât atât, o schimbare a secvenței de ADN codificând pentru anticorp poate afecta abilitatea celulei care conține secvența ADN pentru a exprima, a secreta sau a asambla anticorpi.

155

De aceea nu este totul clar că, va fi posibil să se producă anticorpi funcționali modificați prin tehnici recombinante ale ADN-ului. Cu toate acestea, s-a prezentat un procedeu prin care anticorpii hibridi, în care ambele părți ale proteinei sunt funcționale, pot fi secretați. Acest procedeu este descris în **PCT/GB85/00392**. Totuși, aplicația PCT de mai sus arată numai producerea anticorpilor hibridi în care domeniile variabile complete sunt codificate pentru prima parte a secvenței de ADN. Aceasta nu arată anticorpi hibridi în care secvența domeniului variabil a fost modificată.

160

EP-A-0239400 descrie un procedeu în care CDRs a MAb la șoarece a fost grefat în regiunile cadru ale domeniilor variabile ale Ig uman prin mutageneză directă parțială utilizându-se oligonucleotide lungi. Inventatorii admit posibilitatea de modificare a secvenței naturale de aminoacizi a regiunilor cadru.

Au fost de asemenea efectuate lucrări mai recente privind modificarea MAbs prin grefare CDR pe antigeni sintetici de recunoaștere MAbs, ca de exemplu antigenii NP sau NIP. Totuși, exemplele în care un lizozom de recunoaștere MAb la șoarece și un antigen de recunoaștere MAb la șobolan, pe celulele T umane respectiv, sunt umanizați prin grefare pe CDR, sunt prezentate în literatura de specialitate.

170

Se mai știe că transferul clonei CDRs (așa cum s-a definit în prezenta descriere de invenție) nu este suficient pentru a prevedea o activitate de legare antigenică satisfăcătoare în produsul grefat pe CDR. Referințele din literatura de specialitate arată că este necesar să se convertească un reziduu de serină la poziția 27 a secvenței umane la reziduu de fenilalanină corespunzător la șobolan pentru a obține un produs grefat pe CDR având o activitate de legare antigenică satisfăcătoare. Aceste reziduu la poziția 27 a catenei lungi este un lanț adiacent structural la CDR1. O construcție ulterioară care conține adițional o serină umană la tirozina de șobolan care se schimbă în poziția 30 a

175

180

catenei lungi, neavând o activitate de legare semnificativ modificată față de anticorpul grefat pe CDR cu serina la schimbarea în fenilalanină la poziția 27 numai. Aceste rezultate arată că anticorpul grefat pe CDR recunoaște antigeni mult mai complecși, iar prin schimbările în reziduuri a secvenței umane din afara regiunilor CDR, în special în lanțul adiacent la CDR1, poate fi necesar să se obțină o activitate de legare antigenică efectivă.

Aceste tehnici au fost așadar recent descrise pentru modificarea unui anticorp monoclonal anti-TAC, prin grefare pe CDR. Regiunile cadru umane sunt alese pentru a maximaliza homologia cu secvența anticorp anti-TAC, în timp ce aminoacizii adiționali din afara CDRs sunt reținuți. Anticorpul anti-TAC astfel modificat are o afinitate pentru catena p55 a interleukinei-2 umane, de aproximativ o treime față de murina anti-TAC.

PCT/US89/05857 descrie așadar anticorpul grefat pe CDR, care sunt specifici pentru proteina p55 TAC a receptorului IL-2. Este stabilit că anticorpul grefat pe CDR poate cere ca trei sau mai multe reziduuri aminoacide din donorul Ig în aditie la CDRs, de obicei la cel puțin unul care este imediat adiacent la CDR în Ig donor, să fie schimbați pentru a corespunde cu cel al anticorpului donor în vederea obținerii activității de legare antigenică.

Este deci real aparent că nu este o problemă simplă de a produce un anticorp grefat pe CDR. Adesea nu este suficient, mai mult, să grefezi CDRs din donorul Ig în regiunile cadru din acceptorul Ig. De asemenea este necesar să se modifice reziduurile în regiunile cadru ale anticorpului acceptor în vederea obținerii activității de legare. Cu toate acestea, nu este posibil să se aprecieze, pe baza datelor prezentate până acum în literatura de specialitate, în care este necesar ca reziduurile cadru să fie modificate.

EP-A-O 018794 descrie un MAb murinic care recunoaște o caracteristică antigenică a celulelor T umane helper. Un exemplu special al acestui MAb este descris în descriere și este desemnat ca OKT4. Antigenul se recunoaște în general ca fiind referitor la antigenul CD4. MAb este corespunzător comercial. De asemenea convenabil este și murina MAb cunoscută ca OKT4A. Aceasta recunoaște un epitop diferit pe antigenul CD4 din unul recunoscut de către OKT4.

Experimentele de transplantare la primate au fost indicate ca fiind OKT4 și OKT4A care se pot extinde prin supraviețuire prin grefare și pot fi utilizate ca imunomodulatori umani. Experiența de la tratamentul pacienților cu transplant renal cu murină MAb OKT3 arată că uneori o populație de pacienți dezvoltă neutralizarea anticorpilor la OKT3. Acest răspuns de imunizare exclude administrarea repetată. Pentru a scăde răspunsul imun anticipat la murină anti-CD4 MAb, este de dorit să se producă o versiune grefată pe CDR a OKT4A având murina CDRs și cadrul uman și alte regiuni derivate Ig.

Totuși, așa cum este descris mai sus, simpla apropiere la construcția anticorpului grefat pe CDR nu rezultă întotdeauna într-un anticorp care în mod efectiv se leagă la antigen. Reziduurile exacte care cuprind CDRs sunt dificil de definit, și acestea nu corespund în mod necesar la toate reziduurile în regiunile hipervariabile. Pot exista, de asemenea, reziduurile critice ale cadrului care sunt importante în poziționarea CDRs pentru interacțiunea cu antigenul sau care includ catene lungi și catene scurte în aceste interacțiuni. Este necesar să se modifice anumite reziduuri cadru astfel ca acestea să corespundă la reziduurile murinice în aceste poziții, redând anticorpul grefat pe CDR mai puțin "uman" în caracter.

Molecula anticorp, capabilă să se lege la antigena CD₄, în conformitate cu prezenta invenție, constă în aceea că, în domeniul variabil al numitei catene lungi compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 23, 24, 26 până la 35, 49 până la 65 și 95 până la 102, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un al doilea anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor) așa cum se arată în fig.3, iar în domeniul variabil al numitei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant dintr-un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece(donor) așa cum se arată în fig. 4. În domeniul variabil al numitei catene lungi compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 23, 24, 26 până la 35, 49 până la 65 Si 95 până la 102, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un al doilea anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor) așa cum se arată în fig.3. Reziduurile 6 și 48 din catena lungă compozită corespund suplimentar reziduurilor din anticorpul donor. Reziduurile 71, 73 și 79 din catena lungă compozită corespund suplimentar reziduurilor echivalente din anticorpul donor. Oricare din toate combinațiile reziduurilor 57, 58, 60, 88 și 91 din catena lungă compozită corespund reziduurilor echivalente din anticorpul donor. Reziduul acceptor din catena lungă compozită corespunde reziduurilor echivalente din catena lungă KOL umană, așa cum se arată în fig.5. Catena scurtă complementară este o catena scurtă compozită, în care în domeniul variabil al acestei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un prim anticorp (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor) așa cum se arată în fig.4. În domeniul variabil al numitei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant dintr-un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece(donor) așa cum se arată în fig. 4. Reziduul 89 din catena scurtă compozită corespunde suplimentar reziduului echivalent din anticorpul donor. Reziduurile acceptoare din catena scurtă compozită corespund reziduurilor echivalente din catena scurtă REI umană, așa cum se separă arată în fig. 6. Molecula anticorp are o afinitate pentru antigena CD4 de la $10^5 \cdot M^{-1}$ până la $10^{12} \cdot M^{-1}$. Molecula anticorp are o afinitate pentru antigena CD4 de cel puțin $10^8 \cdot M^{-1}$. Molecula anticorp are o afinitate pentru antigena CD4 similară cu cea a OKT4A. Molecula anticorp este un Ig completă și este izotip IgG₄. Unul sau mai multe reziduuri din domeniile constante ale Ig au fost modificate în scopul alterării funcțiunilor efectoare ale domeniilor constante. Molecula anticorp este obținută prin utilizarea tehnologiei ADN recambinante și se utilizează în terapie, și anume în tratamentul respingerilor de grefă sau în tratamentul tulburărilor celulelor T helper.

Secvența de nucleotide codifică o catenă de anticorp compozită, așa cum aceasta este definită mai înainte și este prezentată în fig. 1 și fig. 2.

Procedeul pentru prepararea moleculei anticorp capabile să se lege la antigena CD₄, în conformitate cu prezenta invenție cuprinde:

a) furnizarea unei prime secvențe ADN, care codifică o catenă lungă compozită, așa cum aceasta este definită mai sus sau o catenă scurtă compozită de asemenea așa cum aceasta este definită mai sus, sub controlul elementelor corespunzătoare din partea superioară și inferioară;

b) transformarea celulei gazdă cu prima secvență ADN; și

c) cultivarea celulei gazdă transformate astfel încât să se producă o moleculă anticorp conform cu cele prezentate mai sus.

Procedeul mai cuprinde

a) furnizarea unei a doua secvențe ADN, care codifică o catenă scurtă sau lungă de anticorp complementară față de prima catenă, sub controlul elementelor corespunzătoare din partea superioară și inferioară;

b) transformarea celulei gazdă atât cu prima cât și cu cea de a doua secvență ADN. Cea de a doua secvență ADN codifică o catenă de anticorp compozită. Prima și a doua secvență ADN sunt prezente în același vector. Secvențele sunt sub controlul acelorași elemente superioare și/sau inferioare diferite. Prima și a doua secvențe ADN sunt prezente în vectori diferiți. Celula gazdă este o celulă CHO.

Metoda pentru tratamentul respingerii unei grefe sau a unei afecțiuni a celulei T helper, în conformitate cu prezenta invenție, constă în aceea că, intervenția asupra organismului viu se realizează direct cu un anticorp grefat CDR, conform celor de mai sus, împreună cu un purtător sau suport acceptabile din punct de vedere farmaceutic, administrat pe căi convenționale, într-o doză zilnică de 0,004 până la 5 mg/kilocorp, de preferință de la 0,05 până la 2 mg/kilocorp.

Abordând problemele inerente, în producerea unui anticorp specific grefat pe CDR, într-o întruchipare preferată a prezentei invenții, s-a procedat la producerea anticorpului grefat pe CDR bazat pe regiunile cadru umane și având o porțiune de legătură antigenică care recunoaște antigenul CD₄. Într-o întruchipare specială preferată, anticorpul grefat pe CDR are o afinitate pentru antigenul CD₄ similară cu cea a murinei MAb OKT4A.

De aceea, conform prezentei descrieri de invenție, se prevede un anticorp grefat pe CDR având cel puțin o catenă în care regiunile cadru sunt predominant derivate din anticorpul prim (acceptor) și cel puțin o CDR care este derivată din al doilea anticorp (donor), anticorpul grefat pe CDR fiind capabil de legare la antigenul CD₄.

De preferință catena grefată pe CDR are două și, mult mai preferabil, toate trei CDRs derivate din anticorpul donor. În mod avantajos, în catena grefată pe CDR, fiecare CDR cuprinde o compoziție CDR care conține toate reziduurile din CDR și toate reziduurile din regiunea hipervariabilă corespunzătoare a anticorpului donor.

De preferință, cel puțin un reziduu din reziduurile regiunilor cadru cu catenă grefată pe CDR a fost modificat, astfel ca să corespundă la un reziduu echivalent în anticorp.

De preferință, regiunile cadru ale catenei grefate pe CDR sunt derivate din anticorpul uman.

În mod avantajos, regiunile cadru ale catenei grefate pe CDR sunt derivate din catena lungă Ig umană. Pentru astfel de catene lungi, se preferă ca reziduu 35 în catena din aceste regiuni să fie modificat astfel ca acesta să corespundă la un reziduu echivalent din anticorpul donor.

RO 114980 B1

În mod avantajos, pentru astfel de catene lungi se preferă cel puțin o compoziție CDR care cuprinde reziduurile 26 până la 35, 50 până la 65 sau 95 până la 102 respectiv, care este grefată pe cadrul uman. Este de apreciat în acest caz că reziduul 35 va corespunde deja la reziduul echivalent din anticorpul donor. 320

De preferință, reziduurile 23, 24 și 49, în astfel de catene lungi corespund la reziduurile 6, 23, 24, 48 și 49 la anticorpul donor în pozițiile echivalente de reziduuri. Dacă se dorește, reziduurile 71, 73 și 79 pot așadar să corespundă.

Într-o afinitate de optimizare, oricare sau orice combinație a reziduurilor 57, 58, 60, 88 și 91 pot corespunde la reziduul echivalent din anticorpul donor. 325

Catena lungă este de preferință derivată din catena lungă umană KOL. Totuși, aceasta poate fi de asemenea derivată din catena umană NEWM sau EU.

În mod alternativ, regiunile cadru sau catenele grefate pe CDR pot fi derivate din Kappa uman sau catena scurtă lambda. Pentru o astfel de catenă scurtă, în mod avantajos cel puțin o compoziție CDR cuprinde reziduurile 24 până la 34, 50 până la 56 sau 89 până la 97 respectiv și se grefează pe cadrul uman. De preferință, reziduul 49 corespunde așadar la reziduul echivalent din anticorpul donor. 330

Pentru o afinitate de optimizare ulterioară, se preferă să se asigure ca reziduurile 49 și 89 să corespundă la reziduurile echivalente din anticorpul donor. Este de asemenea de dorit să se selecteze reziduurile donoare echivalente care formează săruri de legături. 335

Catena scurtă este, de preferință, derivată din catena scurtă umană REI. Totuși, aceasta poate fi de asemenea derivată din catena scurtă EU umană.

De preferință, anticorpul grefat pe CDR, conform prezentei descrieri de invenție, cuprinde o catenă scurtă și o catenă lungă, de preferință una sau ambele care au fost grefate pe CDR în conformitate cu principiile stabilite mai sus pentru catenele lungi și scurte individuale. 340

Într-un caz preferat, este avantajos ca toate trei CDRs de pe catena lungă să fie modificate, și ca modificarea minimală să fie realizată pe catena scurtă. Este de asemenea posibil să se modifice una, două sau niciuna din catenele scurte CDRs și să se rețină încă afinitatea de legare la un nivel rezonabil. 345

Este de apreciat că în unele cazuri, reziduurile donoare și acceptoare atât pentru catenele lungi cât și pentru catenele scurte, pot fi identice la o poziție specială și astfel nu este necesară nici o schimbare a reziduului cadru acceptor. 350

De asemenea, este de apreciat că, în vederea reținerii cât mai mult posibil a naturii umane a anticorpului grefat pe CDR, vor fi efectuate pe cât posibil câteva schimbări de reziduu. Este de asemenea de menționat că în multe cazuri, nu va fi necesar să se schimbe mai mult decât CDRs și un număr de reziduuri cadru. Numai în cazuri excepționale, va fi necesar să se schimbe un număr mai mare de reziduuri cadru. 355

De preferință, anticorpul grefat pe CDR este un Ig complet, ca de exemplu izotopii IgG sau IgG4.

Dacă se dorește, unul sau mai multe reziduuri în domeniile constante ale Ig pot fi schimbate în vederea modificărilor funcțiilor efectoare ale domeniilor constante.

De preferință, anticorpul grefat pe CDR are o afinitate pentru antigenul CD4 între aproximativ $10^5 \cdot M^{-1}$ până la aproximativ $10^{12} \cdot M^{-1}$, mult mai preferat la cel puțin $10^8 \cdot M^{-1}$ și cel mai preferat este ca afinitatea să fie similară cu cea a MAb OKT4 sau OKT4A. 360

În mod avantajos, fiecare din CDR este derivat dintr-un anticorp de mamifere și de preferință este derivat de la MAb murinic.

În mod avantajos, anticorpul grefat pe CDR din prezenta descriere de invenție este produs prin utilizarea tehnologiei ADN recombinant.

Conform cu aspectul al doilea al prezentei descrieri de invenție, se face referire la o metodă de producere a anticorpului grefat pe CDR conform cu primul aspect al prezentei descrieri de invenție, metodă care cuprinde: prevederea unei prime secvențe a ADN, care codifică o primă catenă anticorp în care regiunile cadru sunt predominant derivate de la primul anticorp (acceptor) și cel puțin o CDR este derivată de la al doilea anticorp (acceptor) sub controlul curenților convenabili și elementelor care circulă în partea superioară și în partea inferioară; se transformă o celulă gazdă cu secvența primă a ADN-ului și se aduce în cultură celulele gazdă transformate astfel ca un anticorp grefat pe CDR, conform primului aspect al prezentei descrieri de invenție, să se producă.

De preferință, metoda cuprinde în continuare: prevederea unei secvențe secundare a ADN-ului, codificând a doua catenă complementară a anticorpului, sub controlul elementelor corespunzătoare în sensul superior și inferior de acțiune; transformarea celulei gazdă atât cu prima cât și cu a doua secvență a ADN-ului.

În mod avantajos, secvența a doua conține ADN codificând al doilea anticorp la catena în care regiunile cadru sunt predominant derivate dintr-un prim anticorp (acceptor) și cel puțin un CDR este derivat din cel de-al doilea anticorp (donor).

Prima și a doua secvență de ADN poate fi prezentă pe același vector. În acest caz, secvențele pot fi sub controlul acelorași sau diferitelor elemente în sens superior și/sau inferior.

În mod alternativ, prima secvență și cea de a doua secvență a ADN-ului poate fi prezentă pe vectori diferiți.

Conform celui de al treilea aspect al prezentei descrieri de invenție, se face referire la o secvență de nucleotidă care codifică o catenă de anticorp în care regiunile cadru sunt predominant derivate din primul anticorp (acceptor) și cel puțin un CDR care este derivat din cel de-al doilea anticorp (donor), catena de anticorp fiind capabilă de formarea unui anticorp grefat pe CDR conform primului aspect al prezentei descrieri de invenție.

Este de menționat că anticorpii grefați pe CDR conform prezentei descrieri de invenție vor deveni de un uz special în terapie, în special în tratarea rejecțiilor de grefe sau în tratamentul tulburărilor celulare de helper T.

Anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenție, pot produce printr-o varietate de tehnici, cu exprimare în celule transfectate, cum ar fi, de exemplu, drojdia, insectele, CHO sau celulele mieloma care sunt preferate. Mult mai preferat este ca celula gazdă să fie o celulă gazdă CHO.

Pentru desemnarea anticorpului grefat pe CDR, este mai întâi necesar să se precizeze că secvența din domeniul variabil al anticorpului are proprietățile de legare dorite. Surse de celule convenabile pentru astfel de secvențe ale ADN-ului includ sursele provenite de la vertebrate, altele decât mamifere și de la, ca de exemplu păsări, șoareci, șobolani și iepuri, de preferat fiind șoarecii. Secvențele din domeniul variabil (V_H și V_L) pot fi determinați din catenele lungi și scurte ale cDNA, sintetizate din ARN-ul respectiv prin tehnici generale cunoscute în literatura de specialitate. Regiunile hipervariabile pot fi apoi determinate utilizându-se metoda Kabat. CDRs pot fi determinate prin analiza structurală,

utilizându-se cristalografia cu raze X sau tehnicile de modelare moleculare. O compoziție CDR poate fi apoi definită ca conținând toate reziduurile într-un CDR și toate reziduurile în regiunea hipervariabilă corespunzătoare. Aceste compoziții de CDRs, împreună cu anumite rezidui selectate din regiunea cadru, sunt de preferință transfectate ca "părți de legături antigenice" în timp ce restul de anticorp, cum ar fi catenele lungi și scurte din domeniile variabile constante și regiunile cadru rămase, pot fi bazate pe anticorpi umani ai diferitelor clase. Domeniile constante pot fi selectate pentru a avea funcțiile efectoare dorite, corespunzătoare pentru utilizarea intenționată a anticorpului astfel obținut. De exemplu, izotopii IgG umani, IgG1 și IgG3 sunt efectivi pentru fixarea complementară și liza celulelor mediate. Pentru alte scopuri, alți izomeri cum ar fi IgG2 și IgG4 sau alte clase, cum ar fi IgM și IgE, pot fi mult mai convenabile.

Pentru terapia umană, este de dorit în special să se utilizeze izotopi umani, pentru a minimiza răspunsurile antiglobulinei în timpul terapiei. Secvențele de ADN din domeniul constant uman, de preferință în conjuncție cu bazele lor în cadru variabil, pot fi preparate în conformitate cu procedeele bine cunoscute. Un exemplu din acestea este CAMPATH 1H.

În conformitate cu întrucipările preferate ale prezentei descrieri de invenție, anumiți anticorpi grefați pe CDR sunt prevăzuți să conțină modificări selectate la regiunea cadru asemănătoare cu cea umană (cu alte cuvinte, domeniile variabile din afara CDRs), rezultând într-un anticorp grefat pe CDR cu afinitate de legare satisfăcătoare. O astfel de afinitate de legătură este de preferință de la aproximativ $10^5 \cdot M^{-1}$ la aproximativ $10^{12} \cdot M^{-1}$ și este mult mai preferat la cel puțin aproximativ $10^8 \cdot M^{-1}$. Mult mai preferabilă este afinitatea de legătură aproximativ egală cu cea a OKT4A MAb murinic.

În construcțiile de anticorpi grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenție, segmentele genei V_H și/sau V_L pot fi modificate prin mutageneză. Așa cum este menționat în literatura de specialitate, este de înțeles că diferite alte nucleotide codificând reziduurile de aminoacizi sau secvențele care sunt conținute în porțiunea Fc sau alte zone ale anticorpului, pot fi modificate într-o manieră asemănătoare.

Tehnicile exemplare includ în plus, distrugerea sau substituirea neconservativă a numărului limitat de deferite nucleotide sau substituirea conservativă a multelor nucleotide, cu condiția ca să se mențină citirea cadru.

Substituțiile, distrugerile, inserțiile sau orice subcombinație pot fi utilizate pentru a se ajunge la construcția finală. Deoarece există 64 secvențe codonul posibile, dar numai douăzeci de aminoacizi cunoscuți, codul genetic este degenerat în sensul că diferitele codoane pot produce aceeași aminoacizi. Cu toate acestea, codonul este precis pentru fiecare aminoacid. Astfel există cel puțin un codon pentru fiecare aminoacid, de exemplu fiecare codon produce un aminoacid simplu și nu altul. Este clar că în timpul translației, cadrul de citire propriu trebuie să fie menținut în vederea obținerii secvenței de aminoacid în polipeptida produsă ca fiind ultima.

Tehnicile de adădire, distrugerile sau substituiri la porțiunile de aminoacizi predeterminate având secvențe cunoscute, sunt bine cunoscute în literatura de specialitate. Tehnicile exemplare includ mutageniza parțială directă cu oligonucleotide mediate și reacția de polimerizare în lanț.

Mutageniza directă parțială cu oligonucleotide cuprinde în esență hibridizarea oligonucleotidei codificate pentru mutația dorită cu un simplu filament de ADN care conține regiunea care trebuie să fie mutată și utilizând un filament simplu ca model,

455 pentru extinderea oligonucleotidelor pentru a produce un filament conținând mutația. Această tehnică, în diferite forme, este descrisă în referințele din literatura de specialitate.

Reacția polimerazei în lanț (PCR) este în esență o amplificare a ADN-ului *in vitro*, utilizându-se secvența specifică oligonucleotidelor. Oligonucleotidele pot fi incorporate ca
460 secvențe modificate, dacă se dorește. Tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR) este descrisă în literatura de specialitate. Exemple de mutagenză care utilizează tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR) sunt descrise în literatura de specialitate.

Secvențele nucleotidice, conform prezentei descrieri de invenție, capabile de o exprimare ultimă a anticorpilor grefați pe CDR doriți, pot fi formați într-o varietate a
465 diferitelor polinucleotide (ADN genomic, cADN, ARN sau oligonucleotide sintetice). În prezent, este de preferat ca secvența de polinucleotidă să cuprindă o fuziune a cADN și a ADN-ului genomic. Secvența de polinucleotidă poate codifica diferite componente Ig (de exemplu domeniile V, J, D și C). Acestea pot fi construite printr-o varietate de diferite tehnici. Unind secvențele de cADN și genomice corespunzătoare, cea mai comună
470 metodă de producere este prezentă, dar secvențele de cADN pot fi de asemenea utilizate (cunoscut din literatura de specialitate).

Anumiți vectori de exprimare convenabili și celulele gazdă sunt descriși, de asemenea, în literatura de specialitate.

Vectorii și metodele descrise în prezenta invenție sunt convenabile pentru utilizare
475 în celulele gazdă într-o gamă largă de organisme procariotice și eucariotice.

În general, desigur, procarioticele sunt preferate pentru clonizarea secvențelor de ADN pentru construirea vectorilor utilizați în prezenta descriere de invenție. De exemplu, *Escherichia coli* DH5α este utilizată în special. Acest exemplu desigur este prezentat cu intenția de a fi ilustrativ, mai degrabă decât limitativ.

480 Procarioticele pot fi de asemenea utilizate pentru exprimare. Speciile de *E. coli* mai sus menționate, bacilii de tipul *Bacillus subtilis* și alte enterobacteriacee, ca de exemplu *Salmonella typhimurium* sau *Serratia marcesans* și diferitele specii de *Pseudomonas* pot fi utilizate.

În general vectorii plasmidelor conținând repliconul și secvențele de control, care
485 sunt derivate din specii compatibile cu celula gazdă, sunt utilizate în legătură cu aceste gazde. Vectorul de obicei poartă o porțiune de replicare ca și secvențe de marcare care sunt capabile de o selecție fenotipică prevăzută pentru celulele transformate. De exemplu, *E. coli* este tipic transformată utilizându-se unul din mulții derivați de pBR322, un plasmid derivat de la speciile de *E. coli*. pBR322 conține genele pentru rezistența la
490 ampicilină și la tetraciclină și astfel sunt prevăzute mijloace de analiză pentru identificarea celulelor transformate. Plasmidul pBR322, descendenții acestuia sau alte plasmide microbiene pot conține așadar sau pot fi modificate pentru a conține promotori care pot fi utilizați de către organismele microbiene pentru exprimarea proteinelor recombinante. Acei promotori comuni utilizați în construcția recombinantă de ADN, includ sistemele
495 promotoare de lactoză până la/și sistemele promotoare de triptofan (Trp).

În timp ce acestea sunt utilizate mult mai comun, alți promotori microbieni au fost descoperiți și utilizați, detaliile privind secvențele lor de nucleotide fiind publicate, făcând
capabil pe lucrătorul din acest domeniu de a-i lega funcțional la vectorii plasmidelor.

În plus față de microbii procariotici, eucarioticii, cum ar fi de exemplu culturile de
500 drojdie, pot fi de asemenea utilizați. *Saccharomyces cerevisiae* sau drojdia de bere

comună este mult mai uzual întrebuințată printre microorganismele eucariotice, de altfel un număr de alte specii sunt convenabile. Pentru exprimare în *Saccharomyces*, plasmidele YR_p7 de exemplu, se utilizează de obicei. Acest plasmid conține deja gena trp1 care prevede o selecție a markerului pentru o specie de drojdie mutantă lipsind abilitatea de dezvoltare în triptofan, de exemplu ATCC 44076 sau PEP4-1. Prezența leziunii de trp1 ca o caracteristică a celulelor genomice de drojdie ca gazdă prevede o zonă efectivă de detectare a transformării prin dezvoltarea în absența triptofanului. 505

Secvențele promoționale convenabile în vectorii de drojdie includ promotorii pentru 3-fosfoglicerat chinaza sau alte enzime glicolitice, cum ar fi exemplu enolaza, gliceraldehida-3-fosfat dehidrogenaza, hexochinaza, piruvat decarboxilaza, fosfofructokinaza, glucozo-6-fosfat izomeraza, 3-fosfoglicerat mutaza, piruvat chinaza, trifosfat izomeraza, fosfoglucoza și glucochinaza. În construcția plasmidelor de exprimare convenabile, secvențele terminației asociate cu aceste gene sunt așadar legate la vectorul de exprimare 3' al secvenței dorite a fi exprimată pentru a prevedea poliadenilarea mRNA și terminația. Alți promotori care au un avantaj adițional de transcripție controlată prin condițiile de dezvoltare, sunt regiunile promotoare pentru alcool dehidrogenaza 2, izocitocromul C, acid fosfataza, enzimele degradative asociate cu metabolismul de azot și gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza menționate mai sus, o enzimă responsabilă de utilizarea maltozei și galactozei. Orice vector plasmid conținând un promotor compatibil de drojdie, origina în replicatie și secvențele terminației sunt convenabile. 510 515 520

În aditie la microorganisme, culturi celulare derivate din organisme multicelulare pot fi utilizate ca gazdă. În principiu, orice cultură celulară este utilizabilă, când este provenită din vertebrate sau din organisme de nevertebrate. Mai mult decât atât, interesul a fost mărit la cultura de celule provenită de la vertebrate, la fel ca și propagarea celulelor de vertebrate în culturi (cultură de țesuturi), ceea ce a devenit un procedeu de rutină în anii recentți. Ca exemple se dau linii celulare gazdă, care sunt utilizate, cum ar fi VERO, HeLa, ovarul de hamster chinezesc (CHO), W138, BHK, COS-7, MDCK și liniile celulare mieloma. Vectorii de exprimare pentru astfel de celule pot include (dacă este necesar) o origină corespunzătoare a replicatiei, ca și un promotor localizat în fața genei care trebuie exprimate, împreună cu orice porțiuni de legătură ribozomică necesară, porțiuni de legătură cu ARN, porțiuni de poliadenilare și secvențe transcripționale terminatoare. 525 530

Pentru utilizarea celulelor de mamifere, funcțiile de control pe vectorii de exprimare sunt adesea prevăzuți prin materiale virale. De exemplu, promotorii utilizați de obicei sunt derivați de la *Cytomegalovirusul* uman (HCMV), virusul *Polyoma*, *Adenovirusul* 2 și mult mai frecvent virusul *Simian* 40 (SV40). Promotorii dintâi și cei întârziati ai virusului SV40 sunt utilizați în special, deoarece ambii sunt obținuți ușor din virus, ca un fragment care conține așadar originea virală SV40 a replicatiei. Mai departe, este de asemenea posibil și adesea de dorit să se utilizeze secvențele de control și promotoare asociate normal cu secvența genei dorite, prevăzându-se un astfel de control pentru secvențe compatibile cu sistemul celular gazdă. 535 540

O origine a replicatiei se poate prevedea fie prin construirea vectorului pentru a include o origină exogenă, ca de exemplu cea care poate fi derivată din SV40 sau alți viruși (de exemplu virusul *Polyoma*, *Adenovirusul*, VSV sau BPV) ca sursă, sau se pot prevedea prin mecanismul de replicatie cromozomială a celulei gazde. Dacă vectorul este 545

integrat în cromozomul din celula gazdă, acesta din urmă este de obicei suficient.

Vectorii conținând segmentele de ADN de interes (de exemplu secvențele codificate cu catene lungi și scurte și secvențele de exprimare de control), pot să fie transferate în celulele gazdă prin metode bine cunoscute, care variază dependent de tipul gazdei celulare. De exemplu, transfectarea clorurii de calciu este de obicei utilizată pentru celulele procariotice, de aici și tratamentul cu fosfat de calciu, lipofecția și electroporarea fiind utilizate pentru gazdele celulare diferite.

Odată exprimați, anticorpilor grefați pe CDR conform prezentei descrieri de invenție, pot fi purificați conform procedeeelor standard din literatura de specialitate, incluzând precipitarea cu sulfat de amoniu, coloane de afinitate, cromatografie pe coloană și gel-electroforeza. Afinitățile de legătură ale acestor construcții astfel exprimate pot fi precizate prin tehnici cunoscute în literatura de specialitate, așa cum s-a exemplificat complet în secțiunea din exemplul prezentei specificații.

Anticorpilor grefați pe CDR pur substanțiali, și cel puțin 90 până la 95% omogenitate sunt preferați, omogenitatea de 98 până la 99% sau mai mare fiind cea mai preferată pentru utilizări farmaceutice. Odată purificați, parțial sau cu o omogenitate dorită, anticorpilor grefați pe CDR pot fi apoi utilizați pentru diagnosticare sau cu scop terapeutic (incluzând anticorpilor extracorporali), sau prin procedee de analiză de dezvoltare și de performare, prin colorații imunofluorescente și alte procedee.

Anticorpilor grefați pe CDR conform prezentei descrieri de invenție, vor găsi utilizare în mod tipic în tratamentul tulburărilor medii T-celulare. De exemplu, maladiile tipice stabilite pentru tratament includ grefarea și rejecția de transplant la pacienții având un organ bolnav, cum ar fi inima, plămânul, rinichiul sau ficatul, ca transplant. Alte boli includ bolile autonome, cum ar fi de exemplu diabetul de tip I, scleroza multiplă, artrita reumatoidă, lupusul sistemic eritematos și *miastenia gravis*.

Celulele T sunt expansiuni clonale dintr-o singură celulă care exprimă numai un receptor antigen celular T capabil să recunoască o legătură peptidică la o moleculă HLA specifică pe celule care prezintă antigenul, specializate, cum ar fi de exemplu, macrofagele și alte țesuturi. Activarea acestor celule T poate fi blocată prin recunoașterea anticorpilor din complexul receptor celular T sau complexul peptidic HLA.OKT3 recunoaște molecula CD3 care este cuprinsă în diferite subunități fizic complexate cu receptorul celular T. Diferite alte molecule pe celula T, incluzând moleculele CD4 și CD8 sunt așadar incluse în activarea celulei T prin legarea la molecula HLA, la porțiunile care sunt distincte din porțiunea de legătură receptoare celulară-T.

CD4 este găsită pe subpopulația celulelor T cu receptorii celulelor T care recunosc moleculele din clasa II HLA. De aceea, o apropiere de imunosupresie include utilizarea anticorpilor monoclonali, ca de exemplu OKT4 sau OKT4A care sunt imunodepresivi deoarece aceștia inhibă interacțiunea moleculei CD4 cu molecula II din clasa HLA. Anticorpul legat la CD4 poate rezulta la imunosupresia printr-un număr de mecanisme incluzând inhibiția semnalului de activare normală, împiedicarea căii semnalului de reglare inferioare sau modularea acestui receptor din suprafața celulară. Aceasta ar putea fi de asemenea introdusă cu o subpopulație de celule T capabile de supresarea altor subpopulații aloreactive sau autoreactive. Anticorpilor anti-CD4 pot să acționeze prin inducerea complementului sau a lizei celulare T dependent de anticorp sau prin îndepărtarea celulelor T din circuitul sanguin sau a părților de inflamație. De aceea caracteristicile de legare Fc receptoare pentru fiecare anticorp pot fi importante în

funcția lor. Strategiile alternative includ utilizarea anticorpilor anti-CD4 care au fost radiomarcați sau cuplați la toxine.

Aceste proprietăți imunosupresive ale anticorpilor anti-CD4 prevăd utilizarea terapeutică în supresiunea limfocitelor activate T care mediează maladiile asociate cu transplantarea și autoimunitatea. Molecula de CD4 este așadar receptoare pentru subunitatea gp120 a virusului HIV. Deoarece OKT4A inhibă legarea gp120 la CD4, acest anticorp sau fragmentele acestuia pot bloca infecția virală.

Molecula de CD4 este inclusă normal în prevederea unui semnal costimulator la celulele T ca rezultat al legării la molecula din clasa II HLA. De aceea, este posibil ca anticorpii anti-CD4 să poată prevedea o funcțiune costimulatorie în combinația cu alți reactivi de inducere a semnalului. Această strategie terapeutică poate fi utilizată în tratamentul pacienților imunocompromiși.

Anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenției, pot fi utilizați în combinație cu alți anticorpi, în special MAbs reactivi cu alți markeri asupra celulelor umane responsabile de aceste maladii. De exemplu, anumiți markeri T-celulari convenabili pot să fie incluși, grupați, în așa numiții "clusteri de diferențiere".

În general, prezenții anticorpi grefați pe CDR, vor fi utilizați în forma purificată în combinație cu substanțele suport cu farmacologie corespunzătoare. În mod tipic, aceste substanțe suport includ soluțiile apoase sau alcoolice sau soluțiile apoase, emulsiile sau suspensiile incluzând medii saline și medii tampon. Vehicule parenterale includ soluția de clorură de sodiu, dextroza Ringer, dextroza și clorura de sodiu și soluția Ringer lactat. Astfel de adjuvanți convenabili, acceptați din punct de vedere fiziologic, dacă este necesar pentru menținerea complexului în suspensie, pot fi aleși dintre agenții de îngroșare, cum ar fi de exemplu carboximetilceluloza, polivinilpirolidona, gelatina și alginatii.

Vehiculele intravenoase includ fluide și agenți de alimentare sau agenți electrolitici, cum ar fi de exemplu acei bazați pe dextroze Ringer. Conservanții și alți agenți antimicrobieni, agenții antioxidanți, agenții de chelare și gazele inerte pot fi de asemenea prezenți în aceste preparate.

Anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenției, pot fi utilizați ca compoziții de administrare separate sau în conjuncție cu alți agenți. Aceste preparate pot include diferite medicamente imunoterapeutice, cum ar fi de exemplu ciclosporina, metotrexatul, adriamicina sau cisplatina și imunotoxinele. Compozițiile farmaceutice pot include "cocktailuri" din diferiți agenți citotoxici sau alți agenți în conjuncție cu anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenției, sau chiar combinații de anticorpi grefați pe CDR având diferite specificații.

Calea de administrare a compozițiilor farmaceutice, conform prezentei invenției, poate fi una din cele comune cunoscute din literatura de specialitate. Pentru terapie, fără o limitare imunoterapeutică, anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenției, pot fi administrați la orice pacient în conformitate cu tehnicile standard. Administrarea poate fi realizată prin orice mod convenabil, incluzând calea parenterală, intravenoasă, intramusculară, intraperitoneală sau de asemenea o administrare corespunzătoare prin infuzare directă cu un cateter. Dozajul și frecvența de administrare vor depinde de vârstă, sex și condiția pacientului; o administrare concurentă cu alte medicamente, indicații de dozare și alți parametrii pot fi luați în considerație de către clinician.

Anticorpul grefat pe CDR, conform prezentei descrieri de invenție, pot fi liofilizați pentru conservare și reconstituiți într-un vehicul corespunzător, înainte de utilizare. Această tehnică s-a dovedit a fi efectivă cu imunoglobuline convenționale, utilizându-se tehnici de liofilizare și de reconstituire cunoscute în literatura de specialitate. Se poate aprecia, că așa cum este menționat în literatura de specialitate, liofilizarea și reconstituirea pot conduce la diferite grade a activității anticorpilor (de exemplu cu imunoglobuline convenționale, anticorpi IgM tind la o pierdere de activitate mai mare decât anticorpul IgG) și că utilizarea acestor nivele trebuie să fie ajustată pentru compensare.

Compozițiile care conțin prezenții anticorpi grefați pe CDR sau cocktailurile acestora, pot fi administrate pentru tratamente profilactice și/sau terapeutice. În anumite aplicații terapeutice, o cantitate adecvată pentru a însoți cel puțin parțial inhibarea sau distrugerea populației celulelor selectate, este definită ca "doză terapeutică efectivă". Cantitățile care trebuie să obțină acest dozaj, vor depinde de severitatea bolilor și de starea generală a pacientului cu sistem propriu imunitar, dar în general sunt cuprinse de la 0,005 până la 5,0 mg de anticorp grefat pe CDR /kg corp, iar doze de la 0,05 până la 2 mg/kg/doză care sunt mult mai obișnuite. Pentru aplicații profilactice, compozițiile care conțin anticorpii grefați pe CDR sau cocktailurile acestuia se pot administra în doze similare sau ușor mai scăzute.

O compoziție care conține anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenție, se poate utiliza în scop profilactic sau terapeutic pentru a ajuta la modificarea, inactivarea, distrugerea sau îndepărtarea populației constituită din celulele T selectate, la mamifere.

Conform unei alte întruchipări, construcțiile descrise în prezenta invenție, pot fi utilizate extracorporal sau prin selectivitate *in vitro* pentru a distruge, a slăbi sau a avea alt efect de îndepărtare a populației celulare menționate, dintr-o colecție celulară heterogenă. Sângele de la mamifere poate fi combinat extracorporal cu anticorpi grefați pe CDR din care celulele nedorite sunt distruse sau sunt îndepărtate din sânge pentru a fi readuse la mamifere, conform tehnicilor standard cunoscute.

În plus față de aceste utilizări terapeutice, anticorpii grefați pe CDR vor găsi utilizare în analizele de diagnostic. Anticorpul grefat pe CDR pot fi marcați, în conformitate cu tehnicile cunoscute în literatura de specialitate. Anticorpul grefat pe CDR sunt de asemenea convenabili pentru alte scopuri *in vivo*. De exemplu, anticorpul grefat pe CDR, pot fi utilizați pentru tratamentul selectiv celular al celulelor sanguine periferice acolo unde se dorește numai eliminarea limfocitelor T menționate sau în mod similar în culturile de celule pentru a elimina limfocitele T nedorite.

Prezenta descriere de invenție este descrisă prin exemplu de realizare cu referire la fig. 1...19 în care:

- fig. 1, reprezintă secvența de nucleotidă a domeniului variabil cu catenă lungă OKT4A;
- fig. 2, reprezintă secvența de nucleotidă a domeniului variabil cu catenă scurtă OKT4A;
- fig. 3, reprezintă secvența de aminoacid din domeniul variabil cu catenă lungă OKT4A în care CDRs sunt subliniate;
- fig. 4, reprezintă secvența de aminoacid din domeniul variabil cu catenă scurtă OKT4A în care CDRs sunt subliniate;

- fig. 5, reprezintă o aliniere la KOL cu OKT4A secvența de aminoacid cu catenă lungă grefată pe CDR în care CDRs se subliniază, secvențele umane fiind în partea superioară și secvențele murinice fiind în partea inferioară; 685

- fig. 6, reprezintă alinierea REI cu OKT4A secvența de aminoacid cu catenă lungă grefată pe CDR, care sunt subliniate, secvențele umane sunt în partea superioară și secvențele murinice fiind în partea inferioară; 690

- fig. 7, reprezintă o secvență de ADN și translația de aminoacid cu catenă lungă grefată pe CDR;

- fig. 8, reprezintă o secvență de ADN și translația de aminoacid cu catenă scurtă grefată pe CDR;

- fig. 9, reprezintă construcția vectorului de exprimare cu catenă lungă OKT4A grefată pe CDR; 695

- fig. 10, reprezintă analizele de blocare și legare a construcțiilor cu catene scurte OKT4A grefată pe CDR în combinație cu catene lungi chimerice OKT4A;

- fig. 11, reprezintă analizele de legătură și blocare ale construcțiilor cu catene lungi OKT4A, HCDR1, HCDR2 și HCDR3, în combinație cu OKT4A cu catenă scurtă; 700

- fig. 12, reprezintă alinierea REI la catenele lungi OKT4A grefate pe CDR, LCDR1 și LCDR2 și secvențele cu aminoacizi cu catene scurte OKT4A murinice în care CDRs se subliniază, secvențele umane fiind în partea superioară și secvențele murinice fiind în partea inferioară;

- fig. 13, reprezintă alinierea KOL la catenele lungi grefate pe CDR, HCDR1 prin HCDR10 și secvențele cu aminoacizi cu catene lungi OKT4A murinice în care CDRs sunt subliniate, secvențele umane fiind în partea superioară și secvențele murinice fiind în partea inferioară; 705

- fig. 14, reprezintă legarea și analiza de blocare a construcțiilor cu catene lungi grefate pe CDR, HCDR1, HCDR2 și HCDR3, în combinație cu catenele scurte LCDR2 grefate pe CDR; 710

- fig. 15, reprezintă analizele de legare și blocare a construcțiilor HCDR4 cu catene lungi grefate pe CDR prin HCDR10 în combinație cu LCDR2 cu catenă scurtă;

- fig. 16, reprezintă analizele de blocare a construcțiilor cu catene lungi HCDR5, HCDR6 și HCDR10 în combinație cu construcțiile cu catenă scurtă LCDR2, LCDR3, LCDR2Q, LCDR3Q și LCDR4Q în forma chimerică OKT4A; 715

- fig. 17, reprezintă analizele cu afinitate relativă ale OKT4A construcții HCDR5 și HCDR10 cu catene lungi, în combinație cu construcția LCDR2 cu catenă lungă și formele chimerice și murinice ale OKT3 ca control negativ;

- fig. 18, reprezintă rezultatele studiilor de inhibare a MLR prin diferiți anticorpi utilizându-se T6 ca control negativ; 720

- fig. 19 reprezintă rezultatele studiilor de inhibare a proliferării prin diferiți anticorpi.

Umanizarea OKT4A: OKT4A este un anticorp murinic monoclonal care recunoaște antigenul CD4 localizat în primul rând pe limfocitele helper T. Anticorpul grefat pe CDR au fost construiți astfel ca CDRs din domeniile variabile având atât catene lungi cât și catene scurte, să fie derivate de la secvența murinică OKT4A. Cadrele din domeniul variabil și domeniile constante sunt derivate din secvențele anticorp umane. 725

Cele trei CDRs care se află pe catenele lungi și scurte sunt compuse din acele reziduuri, care după studierea structurală, au demonstrat a fi incluse în legătura 730

antigenică. Teoretic, dacă anticorpul OKT4 murinic cu CDRs se grefează pe cadrul uman pentru a forma domeniul variabil grefat pe CDR și acest domeniu variabil este atașat la domeniile constante umane, rezultă că anticorpul grefat pe CDR ar fi, în esență, un anticorp uman cu specificitate pe OKT4A murinic pentru a lega antigenul uman CD4. 735 Dată fiind natura umană superioară a acestui anticorp, este de așteptat să fie mult mai puțin imunogenic decât OKT4 murinic când se administrează la pacienți.

Urmând testele de legare antigenică a anticorpului OKT4 grefat pe CDR în care numai CDRs sunt grefate pe cadrul uman, s-a demonstrat că nu se produc anticorpi grefați pe CDR având o afinitate rezonabilă pentru antigenul CD4. S-a hotărât astfel ca 740 reziduurile adiționale adiacente la unele CDRs și reziduurile cadru critice sunt necesare să fie transformate de la reziduurile OKT4A umane la cele murinice corespunzătoare în vederea generării anticorpului funcțional.

Izolarea OKT4A cu catene lungi și scurte prin analiza de secvență a cADN și ADN în domeniul variabil:

745 Pentru a desemna anticorpul OKT4A grefat pe CDR, este mai întâi necesar să se determine secvența domeniului variabil al catenelor lungi și scurte murinice OKT4A. Secvența este determinată de la catena lungă sau scurtă cADN care a fost sintetizată din mARN respectiv.

mARN este preparat din celule hibridoma producătoare de OKT4A prin extracție 750 cu tiocianat de guanidină urmată de purificare pe gradient de clorură de cesiu. cADN este sintetizat și colecțiile sunt preparate și ecranate în laborator. cADN este sintetizat din mARN, la care se adaugă linkerii EcoRI și acesta este apoi legat la partea EcoRI a vectorului clonizat Igtlo. Fagul recombinant este grupat în particule infecțioase care sunt utilizate pentru infectarea *E.coli* C600.

755 Această colecție este ecranată pentru secvențele OKT4A cu catene lungi utilizându-se probele de oligonucleotide Cg și FR3. Primerul de secvențare Cg are secvența: 5' GGCCAGTGGATAGAC5 3' și se leagă la domeniul constant IgC murinic. Proba FR3 are următoarea secvență: 5' GGCCGTGTCCTCAGACCT 3' și se leagă la regiunea a treia cadru a domeniului variabil murinic cu catene lungi. Cinci clone pozitive 760 sunt evaluate prin transferul sudic și prin hibridare la probele Cg și FR3 și un cADN la șoarece IgG2a CH3. O singură clonă cu o inserție bp EcoRI care hibridizează la toate trei probele, este selectată.

Colecția este ecranată pentru secvența catenei scurte OKT4A utilizându-se o probă de oligonucleotidă Ck (primerul de secvențare MRNA) cu următoarea secvență: 765 5' GGCTCCAGGTTGCTGATGCTGAAGG 3' și care se leagă la domeniul constant kappa la șoarece. Șase clone pozitive sunt apoi evaluate prin transfer sudic și prin hibridizarea la probele de oligonucleotide T4AK, a cărui secvență este următoarea: 5' GGCTCCAGGTTGCTGATGCTGAAGG 3' și care se leagă la regiunea cadru 3 kappa la șoarece și Ck. O singură clonă care conține o inserție 900 bp EcoRI și este hibridizată 770 la ambele probe, este aleasă.

Catena lungă de cADN 1600 bp este subclonizată în porțiuni EcoRI ale vectorului plasmid pBluescript (Sisteme de Clonizare Strategene) și vectorul de secvențare M13mp8. Catena cADN scurtă 900 bp a fost subclonată în porțiunile EcoRI a vectorului plasmid pUC8 și vectorul de secvențare M13mp19.

775 Metoda catenei terminale dideoxi-nucleotidei, pentru analiza secvenței ADN, se utilizează pentru a determina secvența ambelor modele cu filament simplu răsucit

(M13)și dublu răsucit (plasmid). Secvența regiunilor 5' netranslate, secvențele semnal, domeniile variabile și o porțiune din domeniile constante sunt determinate pentru ambele tipuri de catene cADN lungi și scurte. Secvența ADN pentru catene lungi și scurte este ilustrată în figurile 1 și 2. Translația secvenței din domeniul variabil cu catenă lungă este prezentată în fig. 3. O translație din domeniul variabil cu catenă scurtă este prezentat în fig. numărul 4. 780

Este de notat că secvența nucleotidică dată pentru catena scurtă, are un reziduu A la poziția 163, către începutul secvenței de codificare CDR1 (vezi fig. 2). Translația acestei secvențe dă un reziduu de glutamină la poziția 27 în catena scurtă (vezi fig. 4). 785

Când secvențarea catenei scurte OKT4 este efectuată original, reziduu de nucleotidă 163 este un reziduu care trebuie să fie C, dând un reziduu de prolină la poziția 27 în catena scurtă. Primii anticorpi grefați pe CDR, produși, în prezența invenției sunt construiți astfel ca reziduu 27 cu catenă scurtă să fie reziduu de prolină. Aceasta se poate vedea din fig. 6, 8 și 12. 790

Desemnarea anticorpului OKT4A grefat pe CDR.

Desemnarea anticorpului OKT4A grefat pe CDR este necesar să fie determinată ca reziduuri OKT4A murinice care cuprind CDRs cu catene lungi și catene scurte. Examinarea anticorpului ca structură cristalină prin raze X arată suprafața de legătură antigenică care trebuie localizată pe o serie de trei lanțuri extinzându-se din cadrul b-carrel al domeniului variabil. Aceste lanțuri pot fi astfel utilizate pentru a defini CDRs. 795

Deoarece structura de cristal a OKT4A murinic nu este convenabilă, structura unui anticorp murinic similar al structurii de cristal cunoscute este utilizată pentru a defini reziduurile acestor lanțuri menționate mai sus.

Trei regiuni ale amidei cu hipervariabilitate cu secvențe cadru mai puțin variabile sunt găsite pe ambele catene scurte și lungi. În majoritatea cazurilor aceste regiuni hipervariabile corespund la CDRs, dar se pot extinde de la acestea. S-a hotărât ca o combinație a reziduurilor OKT4A murinic în CDRs și cel în regiunile hipervariabile ar cuprinde compoziția CDRs care trebuie grefată pe cadrul anticorpului uman. Secvențele de aminoacid ale catenelor lungi și scurte OKT4A murinice sunt prezentate în figurile 3 și 4, cu compozițiile CDRs selectate, subliniate. 800 805

Anticorpul uman cu secvență cadru pentru catena lungă este anticorpul uman KOL. KOL este ales deoarece structura cristalografică cu raze X a fost determinată la grad ridicat de rezoluție. Aceasta ar permite o acuratețe moleculară de modelare a anticorpului. Pentru același motiv, secvența cadru a dimerului uman cu catenă scurtă, REI se utilizează pentru catenele cadru, lungi. Secvențele de aminoacid ale KOL și REI sunt arătate în figurile 5 și 6, în comparație cu cele ale domeniilor variabile cu catene scurte (LCDR1) și lungi (HCDR1) pentru OKT4A grefate pe CDR. 810

Catenele lungi grefate pe CDR sunt desemnate a avea o porțiune constantă IgG4 umană. Subclasa IgG4 este selectată pe baza experienței cu anticorpul monoclonal murinic anti-CD3 OKT3 care este utilizat pentru tratarea rejecției renale grefate. OKT3 are un izotop IgG2 murinic și nu se fixează complet la oameni. Izotopul IgG4 uman așadar nu se fixează complet. Catena scurtă OKT4A grefată pe CDR este construită cu domeniul constant kappa uman. 815

Construcția genelor OKT4A grefate pe CDR.

Domeniile variabile grefate pe CDR cu catene lungi și scurte sunt construite prin legarea oligomerilor ADN sintetice filamente dublu răsucite, similar cu metoda utilizată 820

în literatura de specialitate. Capătul 5' al domeniilor variabile conțin secvențele catenelor scurte și lungi ale anticorpilor monoclonali murinici B72,3. Secvența semnal direcționează secreția anticorpului din celulele mamiferelor. O secvență Kozak precede imediat codonul de start AUG pentru a crește translația. Domeniile variabile sunt apoi legate la ADN codificând pentru domeniile constante umane și pentru a crea genele cu catene lungi și scurte grefate pe CDR.

Construcția catenei lungi OKT4A grefate pe CDR.

Un număr de opt perechi de oligomeri complementari, aproximativ 30 bp în lungime, sunt desemnați a avea capete suprapuse și domenii variabile de la porțiunea XhoI localizată în cadrul 2 la partea Hind III la începutul primului domeniu constant. Acești oligomeri în opt perechi sunt sintetizați, legați la un loc, într-o manieră fazică și apoi sunt legați la capătul HindIII5' al domeniului constant ADN uman IgG4. IgG4 ADN se prevede ca ADN genomic. Aceasta este o inserție 2153bp într-un vector ADN fag M13 cu 5' EcoRI și o porțiune de restricție 3' BamHI. CH1, CH2 și CH3 în domenii sunt înconjurate prin patru introni. Gena este modificată prin Celltech, pentru a avea o schimbare C până la A la penultima bază a exonului CH1 și pentru a crea o nouă porțiune Hind III în scopurile de construcție a genei grefate pe CDR.

Capătul 5' al domeniului variabil este construit prin legarea a două perechi complementare de oligomeri sintetici, fiecare fiind de aproximativ 90pb în lungime. Acest fragment care are un capăt 5' EcoRI și un capăt 3' XhoI 2364bp este legat la capătul XhoI al fragmentului descris mai sus pentru a produce gena cu catenă lungă complet grefată pe CDR. Această genă este 2364bp în lungime și are capetele 5' EcoRI și 3' BamHI. Secvența ADN cu translația de aminoacizi ai genei este arătată în fig. 7. Regiunile de interes definite prin numărul de nucleotide sunt următoarele: 1-14, porțiunea EcoRI și secvența Kozak; 15-71, secvența de semnal; 72-146, cadrul 1; 147-176, CDR1; 177-218, cadrul 2; 219-254, CDR2; 255-362, cadrul 3; 363-392, CDR3; 393-431, cadrul 4; 432-727, domeniul CH1; 738-1117, intron; 1118-1153, domeniul hinge; 1154-1271, intron; 1272-1599 domeniul CH2; 1600-1698, intron; 1699-2016, domeniul CH3 și 2017-2366, regiunea netranslată 3'.

Construcția genei cu catenă scurtă grefată pe CDR

Douăsprezece perechi complementare de oligomere sintetice cu capete suprapuse au fost legate simultan pentru a grupa domeniul variabil cu catene lungi grefate pe CDR. Acest fragment are capetele 5' EcoRI și 3' NarI. Acesta a fost legat la capătul 5' NarI al domeniului ADN constant kappa uman. cDNA constant kappa uman a fost modificat prin Celltech pentru a include o porțiune de restricție NarI în codonul trei și patru. Gena cu catenă lungă grefată pe CDR rezultată este 754 bp în lungime și are capetele EcoRI. Secvențele de ADN cu translație de aminoacid este arătată în fig. 8. Regiunile de interes definite prin numărul de nucleotide sunt următoarele: 1-8, porțiunea EcoRI și secvența Kozak; 9-68, secvența semnal; 69-143, cadrul 1; 144-164, CDR1; 165-215, cadrul 2; 216-236, CDR2; 237-338 cadrul 3; 339-356, CDR3; 357-404, cadrul 4; 405-710, domeniul constant kappa și 711-754, netranslat.

Exprimarea anticorpului OKT4A grefat pe CDR

Construcția vectorului de exprimare cu catenă lungă

Un vector de exprimare cu catenă lungă grefat pe CDR este construit prin inserția genei cu catenă lungă în plasmidul de exprimare pEe6HCMVBg12 și aditia fragmentului GS care este compus al originii SV40 și glutamin sintetazei minigene. Aceste faze sunt

diagramate în fig.9. pEe6HCMVBg12 și fragmentul GS sunt prevăzute de Celltech.

pEe6HCMV este digerat la porțiunile de EcoRI și BclI. pEe6HCMVBg12 ADN au 870
fost demetilati prin trecerea prin DAM *E. coli* ca specie GM242, care este lipsită de
deoxiadenozin metilază. BclI va restricționa numai ADN care nu conține N⁶-metilat
deoxiadenozina la o parte de recunoaștere a enzimei. Proeminența care rezultă din
restricția BclI este compatibilă cu BamHI proeminență. Gena cu catenă lungă grefată
pe CDR EcoRI/BamHI (HCDR1) a fost apoi legată la capetele EcoRI/BclI ale 875
pEe6HCMVBg12 pentru a produce pEe6HCDR1.

Un fragment 5500 bp BamHI conținând glutamin sintetaza minigenă și originea
SV40 a replicăției și promotorii apăruți mai devreme și cei apăruți mai târziu, sunt
înserați pe porțiunea BamHI a pEe6HCDR1 pentru a produce pEe6HCDR1. Orientarea
corectă a fragmentului GS este verificată prin restricție. pEe6HCDR1gs este preparat 880
pentru celulele de mamifere cu transfectarea acestora prin metoda lizei alcaline și
purificarea gradientului de clorură de cesiu.

pEe6HCDR1gs este capabil de exprimarea catenei lungi OKT4A grefată pe CDR
în COS și celulele CHO. Promotorul HCMV se întinde 5' la gene cu catenă lungă și se
direcționează în transcripția acesteia. Secvența semnal poliadenilarea SV40, leagă 3' la 885
gena care acționează ca terminator transcripțional. Pentru exprimarea transientă în
celulele COS, originea SV40 a replicăției este prezentă în fragmentul GS 5500 bp.
Minigena GS este prezentată ca un marker selectabil pentru utilizarea următoarelor
transfecții celulare CHO. Exprimarea glutamin-sintetazei minigene este condusă de
promotorul târziu SV40. Fragmentul GS este orientat astfel ca promotorul târziu SV40 890
să conducă transcripția în aceeași direcție ca promotorul HCMV.

Diferite evenimente post-transcripționale produc catena lungă grefată pe CDR. În
nucleu, trei secvențe de intervenție ale porțiunii constante IgG4 sunt separate și exonii
sunt legați la un loc pentru a crea un mRNA matur. Urmând translației, secvența semnal
de 19 aminoacizi este îndepărtată în reticulum endoplasmic brut (ER). Un simplu 895
carbohidrat este adăugat la domeniul CH2 la fiecare catenă în ER și la aparatul Golgi.
Fiecare catenă conține așadar patru legături disulfidice intracatenice. Când o peptidă cu
catenă scurtă este prevăzută printr-un vector de exprimare cu catene scurte
contrasfectate, un anticorp matur este grupat la un loc prin legături reciproce, prin
legături disulfidice a două catene lungi și două catene scurte. 900

Construcția vectorului de exprimare cu catenă scurtă grefată pe CDR

Vectorul de exprimare cu catene scurte OKT4A grefate pe CDR este construit
prin înserarea genei cu catenă scurtă grefată pe CDR în vectorul de exprimare
pEe6HCVBg12 și apoi se adaugă originea SV40 și glutamin sintetaza minigenică care
conține fragmentul GS. Vectorul de exprimare cu catenă scurtă este construit printr-un 905
procedeu esențial asemănător care a fost utilizat pentru vectorul de exprimare cu catenă
lungă, așa cum s-a ilustrat în fig.9. Gena cu catenă scurtă este legată în porțiunea EcoRI
a pEe6HCMVB12 pentru a produce pEe6LCDRI. Orientarea corectă a genei cu catenă
scurtă este verificată prin analiza de restricție. Fragmentul 5500 bp GS este înserat în
porțiunea BamHI pentru a produce pEe6LCDR1gs. Orientarea corectă a fragmentului GS 910
este verificată prin analiza de restricție. pEe6LCDR1gs este preparat pentru transfecția
de celule de mamifere, prin metoda de liză alcalină și purificarea cu gradient fiind clorura
de cesiu.

Ca și cu gena cu catenă lungă grefată pe CDR, transcripția genei cu catenă scurtă grefată pe CDR în pEe6LCDRgs este condusă prin promotorul HCMV și terminația transcripțională este semnalată prin secvența semnal SV40 de poliadenilare. Origina SV40 a replicăției conținută în fragmentul GS permite pentru replicăția autonomă a acestei construcții în celulele COS. Glutamin sintetaza minigenă în fragmentul GS prevede un mecanism pentru selecția și amplificarea în celule CHO.

Procedeul post transcripțional al mARN cu catenă scurtă grefată pe CDR nu este necesar înainte de translație deoarece niciun intron nu este prezentat în genă. Urmând translației, secvența lider este îndepărtată din ER brut. Sunt formate două legături disulfidice intracatenice. Gruparea anticorpilor maturi este discutată în secțiunea dinainte.

Exprimarea transientă a celulelor COS-1 OKT4A grefate pe CDR

Exprimarea transientului genelor grefate pe CDR în celule COS-1, prevăd un sistem convenabil și rapid de testare a exprimării și funcției anticorpului OKT4A grefat pe CDR. Celulele COS-1 exprimă consecutiv antigenul T mare SV40 care suportă replicăția transientă a epizomilor purtați de replicăția de origine SV40. Vectorii de exprimare ai genei grefate pe CDR pEe6HCDR1gs și pEe6LCDR1gs conțin origina SV40 a replicăției ca o porțiune a fragmentului GS. După transfectare în celule COS-1, vectorii de exprimare sunt replicați în nucleu la un număr mare de exemplare rezultând în nivelele de exprimare relativ superioare.

Celulele COS-1 sunt obținute din Colecția de Cultură de Tip American (CRL 1650) și aduse într-un mediu de cultură Eagle Dulbecco Modificat (DMEM) cu ser de vițel fetal 10% concentrație. Vectorii de exprimare a genei grefate pe CDR sunt transfectați în celule COS utilizându-se metoda dextran-DEAE urmată de șoc DMSO. Pe cur, 0,2 ml din 1 mg/ml de DEAE-dextran în amestec tampon se adaugă la 15 mg vector ADN în 0,8 ml DMEM/Tris. Aceasta se adaugă la $1 \dots 1,5 \times 10^6$ celule în 60 ml de cultură de țesuturi și se incubează timp de aproximativ 6 h. Complexul DEAE-dextran/DNA este îndepărtat și se adaugă DMSO 10% concentrație în tampon la acest disc timp de două minute. Acesta se îndepărtează, celulele se spală odată cu DMEM și apoi se incubează cu DMEM conținând ser de vițel fetal 10% concentrație, timp de 3...4 zile. În acest timp supernatantul din recipient este recoltat și examinat pentru nivelele de anticorp și pentru abilitatea de legare a limfocitelor CD4 pozitive. Nivelul de anticorpi este determinat prin ELISA. Recipientele sunt acoperite cu un anticorp specific de capră Fc antiuman. Diferitele diluții din supernatantul celular COS conținând anticorpul secretat sunt adăugate, incubate timp de o oră la temperatura camerei într-o cameră umedă și apoi sunt spălate. Se adaugă apoi un anticorp cu catenă kappa antiuman de capră legat la peroxidaza din hrean, care este apoi incubată timp de o oră la temperatura camerei și apoi se spală. Substratul pentru peroxidază din hrean este adăugat pentru detecție. Nivelele OKT4A grefate pe CDR urmează contranfecției pEe6HCDR1gs și pEe6LCDR1gs în ordinul de la ng/ml 200 la 1200 ng/ml de supernatant celular COS.

Studii de legătură antigenică

OKT4A grefat pe CDR produs de celulele COS se testează pentru abilitatea acestuia de a se lega la limfocitele din sângele uman periferic (PBLs) sau linia celulară HPBALL CD4-pozitivă (leucemia limfocitică acută din sângele periferic uman). Așadar acesta este testat pentru abilitatea de blocare a legăturii OKT4A murinice la aceste celule. Legarea este măsurată prin procedeul următor: PBLs se izolează din celulele

HPBAIL care sunt recoltate din cultura celulară. Celulele sunt incubate la temperatura de 4°C timp de o oră, cu diferite diluții ale anticorpului testat, controlul pozitiv al anticorpului sau controlul negativ la anticorp. Celulele sunt spălate odată și apoi sunt incubate la temperatura de 4°C timp de o oră cu un IgG antiuman de capră marcat FITC (Fc absorbit la șoarece). Celulele sunt spălate de două ori și analizate prin citofluorografie. OCT4A chimeric (descriș mai jos) este utilizat ca control pozitiv. OCT4A murinic FITC marcat este utilizat ca control pozitiv pentru legarea directă. Celulele incubate cu supernatantul celular COS mock-transfectat, urmat de IgG antiuman de capră FITC marcat, prevede un control negativ. 965

Testarea abilității OKT4A grefat pe CDR pentru blocarea legăturii murinice OKT4A se realizează prin incubarea celulelor de PBLs sau HPBALL, la o temperatură de 4°C timp de o oră, cu diferite diluții ale anticorpului de testat sau ale anticorpului de control. O cantitate de saturare fixată de FITC-OKT4A este adăugată. Probele sunt incubate timp de o oră la temperatura de 4°C, apoi sunt spălate de două ori și analizate prin citofluorografie. Controalele pozitive sunt FITC marcate OKT4A pentru a determina maximum de legătură și OKT4A murinic nemarcat, ca referință standard pentru blocare. Controalele negative sunt celule necolorate cu sau fără supernatant celular mock-transfectat. 970 975

Abilitatea catenei scurte OKT4A grefate pe CDR de legătură a celulelor CD4 pozitive și de blocare a legăturii OKT4A murinic este inițial testată în combinație cu OKT4A chimeric cu catenă lungă. Catenă lungă OKT4A chimerică este compusă dintr-un domeniu variabil OKT4A murinic și o porțiune constantă IgG4 umană. Gena cu catenă lungă chimerică este exprimată în același vector de exprimare utilizat pentru genele grefate pe CDR. Vectorul de exprimare cu catenă scurtă grefată pe CDR și vectorul de exprimare cu catenă lungă chimerică, sunt contrasfectați pe celulele COS. Anticorpul OKT4 chimeric complet (catenă scurtă chimerică și catenă lungă chimerică) a fost găsit a fi complet capabil de legare la celulele CD4 pozitive și de blocare a legăturii OKT4 murinic la aceste celule. 980 985

Așa cum este ilustrat în fig. 10, catenă scurtă OKT4A grefată pe CDR, LCDR1, în combinație cu catenă lungă OKT4A chimerică, este incapabilă de legătură la celulele CD4 pozitive sau de blocare a legăturii OKT4A murinic la aceste celule. 990

Figura 11 arată studiile de legare și studiile de blocare efectuate cu catene lungi OKT4A grefate pe CDR, HCDR1, combinate cu catenă scurtă OKT4A chimerică. Catenă scurtă OKT4A chimerică este compusă dintr-un domeniu variabil OKT4A murinic și un domeniu constant kappa uman. Este așadar exprimat în același vector de exprimare cum este utilizat pentru anticorpii grefați pe CDR. Celulele COS sunt co-transfectate cu vectorul de exprimare cu catenă lungă grefată pe CDR și vectorul de exprimare cu catenă scurtă chimerică. 995

HCDR1 cu catenă lungă OKT4A grefată pe CDR, în combinație cu catenă scurtă OKT4A chimerică, este așadar incapabil de legare la celulele pozitive CD4 sau de blocare a legăturii OKT4A murinic la aceste celule. 1000

Modificarea anticorpului grefat pe CDR

Datele de legare și de blocare demonstrează clar că anticorpul grefat pe CDR desemnat inițial nu este capabil de recunoaștere a antigenului CD4. O altă modificare a anticorpului este necesară. Este necesar ca CDRs OKT4A murinic să fie în continuare expandat sau este necesar ca reziduurile cadru critice incluse în poziționarea CDRs, ca 1005

și interacțiunile dintre domeniile de grupare cu catenă lungă și scurtă să fie schimbate de la uman la cele de șoarece.

Modelele moleculare sunt utilizate pentru a identifica reziduurile care par mult mai critice pentru interacțiunea antigenică plină de succes. Modelarea a fost efectuată la Celltech.

Modificarea catenei scurte grefate pe CDR

Structura de cristal a OKT4A n-a fost determinată ca model molecular chiar pentru OKT4A care nu s-a utilizat în această analiză. Pentru analizarea reziduurilor cu catene scurte grefate pe CDR, un model molecular al catenei scurte REI umane este superimpozat cu un fragment de MOPC 603 Fab la șoarece. Catenă scurtă MOPC 603 este similară în secvența de aminoacizi la OKT4A. Așadar, au fost efectuate studii în cazul în care catene scurte REI umane și catene lungi KOL umane au fost scurtate. Deciziile au fost efectuate pentru extinderea CDR1 prin reziduuri de conversie 33 și 34 din Leu uman și Asp uman la Ile și Ala de la OKT4A murinic. Reziduul uman REI Glu38 este găsit a fi inclus în gruparea de catene lungi și catene scurte. Prin schimbarea acestui reziduu în OKT4A murinic, His 38 poate fi benefic. Reziduul 49 la capătul terminal aminic intră direct în contact cu CDR2 și astfel în contact cu CDR3 a catenei lungi. Reziduul 89 aproape de capătul terminal aminic al CDR3, interacționează cu Phe98 al catenei scurte și astfel intră în contact cu CDR3 al catenei lungi. REI Tyr49 și Gln89 sunt schimbate în OKT4A murinic His49 și Leu89.

Noua genă cu catenă scurtă OKT4A grefată pe CDR care este generată prin schimbările de mai sus, este desemnată ca LCDR2. O comparare a secvenței domeniilor variabile ale REI, LCDR2 umane și asumate cu catenă scurtă OKT4A murinică este arătată în fig. 12. Schimbările sunt efectuate prin codoane modificate prin mutagenază parțială directă. Vectorul phagemid bluescript din Sistemele Stratagene de Clonizare, sunt utilizate pentru generarea modelului simplu răsucit pentru mutagenază. Vectorul de exprimare pEe6LCDR2gs este construit în aceeași manieră ca și pentru LCDR1. Celulele COS sunt co-transfectate cu pEe6LCDR2gs și cu vectorul de exprimare cu catenă lungă chimerică.

Rezultatele studiilor de legare și blocare sunt arătate în fig.10. Versiunea LCDR2 a catenei scurte OKT4A grefate pe CDR, în combinație cu catenă lungă OKT4A chimerică, este capabilă de legare a celulelor CD4 pozitive și de blocare a legăturii murinice OKT4A. Aceste date arată că LCDR2 este o catenă scurtă OKT4A grefată pe CDR funcțională.

Modificarea catenei lungi grefate pe CDR

Catenă lungă de model molecular a anticorpului KOL uman este utilizată pentru studii de modelare. Toate schimbările de reziduuri au fost efectuate prin mutagenază parțială directă pe codonii care vor fi schimbați. S-a hotărât să se efectueze Glu57 și His58 din KOL la Thr57 și Tyr58 a OKT4A murinic. Astfel are loc o revizuire a catenei lungi grefate pe CDR, care a fost desemnată ca HCDR2. În plus, față de schimbările la reziduurile 57 și 58, reziduul 24 se întinde aproape de CDR1 și poate fi cuprins în CDR1 poziționat. Așadar, reziduurile 88 și 91 sunt conținute în gruparea de domenii variabile cu catene lungi și se interfațează între catenele lungi și cele scurte. Aceste trei reziduuri adiționale se schimbă de la KOL la OKT4A murinic fiind încorporate într-o versiune HCDR3 cu catenă lungă. O comparație a secvenței de aminoacid în domeniul variabil pentru KOL, HCDR1, HCDR2, HCDR3, OKT4A murinic cu catenă lungă și versiunile care

vor fi descrise mai departe, este ilustrată în fig.13.

Vectorii de exprimare pEe6HCDR2gs și pEe6HCDR3gs sunt co-transfectați pe celulele COS fie cu vectorul de exprimare cu catenă lungă OKT4A chimeric fie cu pEe6LCDR2gs. Datele privind legarea și blocarea, sunt prezentate în fig.11 și 14. Nici HCDR2, nici HCDR3 nu sunt capabili să interacționeze efectiv cu antigenul când acesta este combinat cu o catenă scurtă OKT4A grefată pe CDR sau cu o catenă lungă chimerică. 1055

Alte modificări la catena lungă grefată pe CDR sunt explorate. Este de asemenea efectuată o decizie de schimbare a KOL Tyr35 în OKT4A murinic Ser35. Modelul molecular demonstrează că reziduul 42 este inclus în poziționarea CDR2. Reziduul 44 este inclus în contactele catenelor scurte. Este de asemenea benefic să se schimbe KOL Gly42 și Gly44 în OKT4A murinic Glu42 și Arg44. KOL Ala60 este echimbat în OKT4A Pro60 murinic. Aceste schimbări sunt introduse în diferite combinații, în timp ce sunt reținute schimbările efectuate pe reziduurile 24, 57, 58, 88 și 91 în versiunile prealabile. Aceste ultime versiuni sunt denumite ca HCDR4, HCDR5, HCDR6, HCDR7 și HCDR8. Schimbările de reziduuri din fiecare, sunt descrise în fig.13. Același vector de exprimare este utilizat și cu alte construcții. Celulele COS sunt co-transfectate cu vectorii de exprimare cu o nouă catenă lungă și pEe6LCDR2gs. 1060 1065 1070

Rezultatele studiilor de legare și blocare în combinație cu LCDR2 (vezi fig.15) arată interacțiunile pozitive cu antigenul CD4 în toate aceste versiuni cu excepția HCDR8. Aparent, conversiunea Tyr35 în Ser35 murinic este o schimbare critică. Schimbarea în reziduu murinic la poziția 60 pare că intensifică interacțiunea antigenică (se compară HCDR6 cu HCDR4) în timp ce schimbarea la poziția 44 pare a fi inhibitor slab (HCDR5 față de HCDR4 și HCDR7 față de HCDR6). 1075

Pentru a determina dacă schimbările reziduurilor 35 și 60 ar fi suficiente pentru legarea antigenului, HCDR9 (reziduurile murinice la pozițiile 24, 35, 57, 58, 88, 91) și HCDR10 (reziduurile murinice la pozițiile 24, 35, 57, 88, 91) a fost efectuată mutageneza parțială directă. 1080

Același sistem vector de exprimare este utilizat pentru aceste versiuni având catene lungi grefate pe CDR. Aceștia sunt co-transfectați în celule COS cu pEe6LCDR2gs.

Rezultatele experimentelor de legare și blocare sunt ilustrate în fig.15 la un loc cu versiunile precedente cu catenă lungă grefată pe CDR. În mod clar, schimbările efectuate la reziduurile 42 și 44 în versiunile precedente nu sunt necesare, contrar criteriilor stabilite în PCT/US89/05857. Schimbarea la reziduul60, prezent în HCDR10, dar nu și în HCDR9, este folositoare. 1085

Un rezumat al catenelor lungi OKT4A grefate pe CDR și al activității lor în analizele de legare și blocare, sunt prezentate în tabelul 1. Cel mai activ anticorp OKT4A grefat pe CDR care conține cele mai puține reziduuri murinice reprezintă o combinație de HCDR10 și LCDR2. 1090

1095

Catenele lungi OKT4A grefate pe CDR și activitățile acestora

1100

Grefat pe CDR H6	Reziduu nou schimbare +	Total reziduuri murinice++	Activi-tate de legare	Activi-tate de blocare
HCDR1	niciunul	niciunul	-	-
HCDR2	57,58	57,58	-	-
HCDR3	24,88,91	24,57,58,88,91	-	-
HCDR4	35,42	24,35,42,57,58,88,91	++	++
HCDR5	35,42,44	24,35,42,44,57,58,88,91	++	++
HCDR6	35,42,60	24,35,42,57,58,60,88,91	++	+++
HCDR7	35,42,44,60	24,35,42,44,57,58,60,88,91	++	++
HCDR8	42,44,60	24,42,44,57,58,60,88,91	+	-
HCDR9	35	24,35,57,58,88,91	++	++
HCDR10	35,60	24,35,57,58,60,88,91	++	+++

1105

1110

+ Reziduurile sunt denumite conform numărului de poziție Kabat

++ Reziduurile murinice se referă numai la acele regiuni cadru, nu la CDRs

1115

Construcții alternative cu catene scurte

Așa cum s-a precizat mai sus, construcțiile cu catenă scurtă prezente produse pe considerentul că la poziția 27 în catenă scurtă OKT4A, există un reziduu de prolină. Odată ce acesta este apreciat că poziția 27 ar reprezenta un reziduu de glutamină, trei noi construcții cu catenă scurtă sunt astfel produse și exprimate. LCDR2Q, LCDR3Q și LCDR4Q sunt marcate, fiind identice cu LCDR2, LCDR3 și respectiv LCDR4 exceptând faptul că la poziția 27 există o glutamină (Q) în loc de reziduul prolinic (P). S-a demonstrat că aceste catene scurte, păstrează completa activitate. Altele care arată acest fapt, sunt prezentate în fig. 16.

1120

1125

1130

Este de asemenea de notat că prolina este semnificativ diferită de alți aminoacizi prin aceea că are o structură plană. De aceea s-a găsit în mod comun că la părțile secvențelor de peptide se produce o schimbare în orientarea catenei. De aceea este asemănător că structura catenei scurte CDR1 având prolină la reziduul 27, va fi semnificativ diferită de cea a catenei scurte CDR1 având glutamină la reziduul 27. În ciuda acestui fapt, s-a demonstrat că două catene scurte sunt echivalente dintr-un punct de vedere funcțional. Aceasta suportă punctul de vedere de exprimare că nu este necesar să se schimbe toate cele șase CDRs din anticorp în vederea producerii unui anticorp grefat pe CDR, funcțional.

Modificările alternative ale catenelor lungi și scurte grefate pe CDR

RO 114980 B1

Schimbările de reziduuri efectuate în versiunile ultime ale catenelor lungi și scurte grefate pe CDR au la bază modelul molecular al RE1, KOL și anticorpul referitor la șoarece, MOPC 603, mai de grabă decât anticorpii însăși, grefați pe CDR. Unele din aceste modificări nu pot fi necesare pentru legare, în special la afinități de legătură mai slabe. Astfel au fost construite diferite gene cu catene lungi și scurte în care unele din reziduurile cadru în prealabil modificate în reziduuri la șoarece, au fost schimbate înapoi la cele umane. În general, acele reziduuri care nu sunt implicate direct în lungimea CDRs sau CDRs poziționate, pot fi schimbate înapoi în reziduuri umane în diferite combinații. Tabelul 2 următor prezintă liste din aceste gene cu catene lungi și scurte cu numerele de reziduuri care revin de la murinic la uman. Mutageneza parțială directă este utilizată pentru construirea acestor gene. Acestea vor fi exprimate în celule COS, și abilitatea lor de a recunoaște CD4 va fi testată prin analize de legătură și blocare. Cel mai dezirabil anticorp grefat pe CDR este unul cu cele mai puține reziduuri murinice care este capabil de recunoaștere a CD4 cu o afinitate similară cu cea a OKT4A murinic.

Tabelul 2

Modificările catenelor lungi și scurte grefate pe CDR

Construcția	Schimbarea reziduului+	Reziduuri murinice totale++
Catenă scurtă LCDR3	38	33, 34, 49, 89
LCDR4	49	33, 34, 38, 89
LCDR5	89	33, 34, 38, 49
LCDR6	38, 49, 89	33, 34
Catenă lungă HCDR11	89, 91	24, 35, 47, 58, 60
HCDR12	24, 88, 91	35, 57, 58, 60

+ reprezintă reziduuri denumite de numărul de poziție Kabat. Reziduurile notate vor fi schimbate din secvența murinică în secvența umană

++ reziduurile murinice se referă la reziduurile în cadru, nu la CDRs.

Determinarea activității de legare relativă:

Afinitățile de legare relativă sau anticorpii monoclonali anti-CDR4 grefați pe CDR sunt determinați prin legătura de competiție, utilizându-se linia celulară T umană HPB-ALL ca sursă de antigen CD4 și OKT4A murinic conjugat cu fluoresceină (F1-OKT4A) cu afinitate de legare cunoscută ca anticorp tracer F1-OKT4A. Afinitatea de legătură a anticorpului tracer F1-OKT4A este determinată prin analiza directă în care cantitatea crescută de F1-OKT4A este incubată cu HPB-ALL (5×10^5) în PBS cu ser de vițel fetal 5% concentrație, timp de 60 min la temperatura de 40°C. Celulele sunt spălate și intensitatea fluorescenței este determinată cu ajutorul unui citometru calibrat ca debit FACScan, cu cantități microbiene stabilite. Intensitatea fluorescenței per moleculă de anticorp (raportul F/P) a fost determinată prin utilizarea microstraturilor care au un număr predeterminat la porțiunile de legătură ale anticorpului IgG la șoarece. F/P egalează intensitatea fluorescenței acestor straturi saturate cu F1-OKT4A divizate

1180 printr-un număr de porțiuni de legătură per strat. Cantitatea de legături și F1-OKT4A liberi este calculată din intensitatea medie de fluorescență per celulă și raportul legat liber este calculat față de numărul de moli ai legăturii anticorpului. O adaptare lineară este utilizată pentru a determina afinitatea de legătură (valoarea absolută a pantei).

1185 Patru legături competitive, cantități crescute de anticorp competitor sunt adăugate la doza de sub-saturare a F1-OKT4A și se incubează cu 5×10^5 HPB-ALL în 200 μ l de PBS cu ser de vițel fetal 5% concentrație, timp de 60 min la temperatura de 4°C. Intensitățile de fluorescență ale celulelor sunt măsurate cu ajutorul citometrului debit calibrat FACScan, cu standarde microstraturi cantitative. Concentrațiile de legături și F1-OKT4A libere sunt calculate. Afinitățile anticorpilor competitivi sunt calculate din ecuația $[X]\text{-}[F1\text{-}OKT4A] = (1/K_x) - (1/K_a)$, unde K_a este afinitatea OKT4A murinic, K_x este afinitatea competitorului x, $[]$ este concentrația anticorpului competitor la care raportul de legătură legat/liber este R/2 și R este legătura legat/liber, maximă.

1190 Rezultatele de afinitate

1195 Constantele de afinitate relativă ale anticorpilor umanizați (vezi fig. 17, tabelul 3) sunt determinate și LCDR2 combinat cu HCDR10 reține 68% din activitatea parentă. LCDR2/HCDR5 (vezi tabelul 1) reține numai 13% din afinitatea anticorpilor murinici. Aceste rezultate sunt în conformitate cu cele obținute prin analizele de blocare (vezi fig. 16a și 16b). Compararea HCDR5 cu HCDR7 (vezi fig. 15) sugerează că reziduul 60, nefiind critic pentru activitate, este folositor când se transformă în cel al secvenței donoare. În aceeași figură, efectul de distrugere al reziduului donor la poziția 44, poate fi așadar observat (HCDR4 față de HCDR5).

Tabelul 3

Constantele afinității relative ale anticorpilor grefați pe CDR

1205 Construcții de anticorpi	Log.conc.competitor [pM] la inhibare 50%	Afinitate constantă [Kx]
OKT4A murinic	2,4	3×10^9
OKT4A chimeric	2,9	$1,1 \times 10^9$
LCDR2/HCDR10	2,6	$2,1 \times 10^9$
LCDR2/HCDR5	3,4	$0,4 \times 10^9$
1210 OKT3 chimeric	nici o inhibiție	
OKT3 murinic	nici o inhibiție	

Studii funcționale.

1215 Se crede că, antigenul CD4, care esre recunoscut de OKT4A, ca și echivalenții săi chimerici și grefați pe CDR, sunt incluși în interacțiunile care se intensifică în ceea ce privește funcțiile biologice ale limfocitelor T care poartă antigenul CD4. În special, se crede că antigenul CD4 este conținut în amestecul de reacție limfocitar (MLR) și în celulele mononucleare din sângele periferic în proliferare. În vederea demonstrării că anticorpii grefați pe CDR, conform prezentei descrieri de invenție, probabil au o oarecare activitate biologică ca OKT4A murinică sunt efectuate următoarele studii funcționale.

Inhibarea MLR.

PBMC uman este izolat prin centrifugare cu gradient de densitate cu Ficoll și se resuspendă în DMEM complet, conținând 1% ser de vițel fetal (FCS). Se adaugă apoi 2×10^5 PBMC și 1×10^5 PBMC alogenic iradiat (2 Mrad), la fiecare din discurile cu țesuturi de cultură bune (96), urmând diluții seriale din anticorpurile purificate anti-CD4. 1225
 Celulele sunt aduse în cultură timp de 6 zile, pulsate cu 3 H-timidină timp de 24 h și recoltate. Încorporarea a 3H-timidinei este măsurată prin scintilație lichidă.

Ca un control negativ, celulele responder iradiate sunt utilizate în locul PBMC alogenice iradiate, nefiind adăugat nici un anticorp. Ca un control pozitiv, experimentul este efectuat cu adăugarea anticorpilor. În experiment, anticorpii utilizați sunt OKT4A murinic, 1230
 OKT4A chimeric și fragmentul F(ab')₂ din OKT4A murinic.

Rezultatele experimentului sunt arătate în fig. 18. Atât OKT4A chimerice cât și OKT4A murinice arată o inhibiție similară a MLR.

Inhibarea proliferării.

OKT3 (20 ng/ml), un MAb murinic care recunoaște CD3 antigenul pe limfocitele 1235
 T, este imobilizat pe polistiren, plăci de cultură tisulară bune (96) timp de 4 h la temperatura de 20°C. Discurile sunt apoi spălate de trei ori cu fosfat salin tamponat (PBS) și apoi se adaugă 1×10^5 PMBC la fiecare recipient. După aceea, sunt adăugate diluțiile seriale cu anticorpi anti-CD4. Celulele se aduc în cultură timp de 72 h, pulsate cu 3H-timidina timp de 24 h și se recoltează. 3H-timidina încorporată este măsurată prin 1240
 scintilație lichidă.

Ca control negativ, proliferarea este măsurată în absența anticorpilor OKT3 și anti-OKT4. Ca control pozitiv, proliferarea este măsurată în prezența numai a OKT3. În acest experiment, anticorpii utilizați sunt OKT4A murinic, OKT4A chimeric și fragmentul F(ab')₂ din OKT4A murinic. 1245

Rezultatele experimentului sunt prezentate în fig. 19 care arată că OKT4A chimeric are substanțial aceeași abilitate de inhibare a proliferării ca și OKT4A murinic.

Studiile funcționale de mai sus arată că OKT4A chimerice au proprietăți biologice echivalente cu OKT4A murinic. Deoarece anticorpii anti-OKT4 grefați pe CDR au substanțial aceeași afinitate pentru antigenul CD4 ca și anticorpurile OKT4A chimerice, și 1250
 deoarece anticorpurile OKT4A chimerice au aceleași domenii constante ca și anticorpii OKT4 grefați pe CDR, este de așteptat ca anticorpii OKT4 grefați pe CDR să aibă aceleași funcții biologice ca OKT4A murinic și astfel va fi de folos în terapie.

Sumar.

Un număr de anticorpi OKT4 diferit grupați pe CDR au fost generați. În esență, 1255
 ADN codifică CDRs pentru OKT4A murinic cu catene lungi și catene scurte care se grefează pe cadrul catenei umane lungi KOL și genele anticorpului REI cu catenă scurtă. Aceste domenii variabile sunt legate la ADN codificând porțiunea constantă cu catene lungi IgG4 și catene scurte kappa umane. Genele rezultate grefate pe CDR sunt exprimate prin celulele 1260

COS-1. Anticorpurile secretate în mediul de cultură tisulară sunt colectate, cuantificate prin ELISA și testate pentru abilitatea sa de legare la celulele pozitive CD4 și de blocare a legăturii cu OKT4A murinic.

Anticorpurile grefate pe CDR desemnate inițial sunt incapabile să interacționeze cu CD4. Un număr de modificări sunt făcute la catena scurtă, când reziduurile cadru umane 1265
 critice în secvența REI, identificate prin modelul molecular, sunt schimbate în reziduurile

murinice OKT4A. Această versiune nouă a catenei scurte, LCDR2, este capabilă de a recunoaște antigenul CD4. În mod similar, un număr de reziduuri cadru umane cu catenă lungă sunt schimbate în murinice prin diferite combinații pentru a genera HCDR2 până la HCDR10. Diferite catene lungi, în combinație cu LCDR2, au bună competiție față de anticorpul OKT4A murinic pentru CD4. OKT4A grefat pe CDR prezent în selecție este în combinația LCDR2Q și HCDR10. Alte versiuni ale catenelor lungi și scurte sunt curent generate când reziduurile cadru care sunt recent modificate în reziduuri murinice sunt schimbate înapoi în reziduuri umane. Acești anticorpi grefați pe CDR mult mai umanizați vor fi testați pentru abilitatea lor de recunoaștere a CD4.

Revendicări

1. Moleculă anticorp, capabilă să se lege la antigena CD4, care conține o catenă lungă compozită și o catenă scurtă complementară sau conține o catenă scurtă compozită și o catenă lungă complementară, **caracterizată prin aceea că**, în domeniul variabil al numitei catene lungi compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 23, 24, 26 până la 35, 49 până la 65 și 95 până la 102, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un al doilea anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor) așa cum se arată în fig. 3, iar în domeniul variabil al numitei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant dintr-un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece(donor) așa cum se arată în fig. 4.

2. Moleculă anticorp, capabilă să se lege la antigena CD4, care conține o catenă lungă compozită și o catenă scurtă complementară, **caracterizată prin aceea că**, în domeniul variabil al numitei catene lungi compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 23, 24, 26 până la 35, 49 până la 65 și 95 până la 102, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un al doilea anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor) așa cum se arată în fig.3.

3. Moleculă anticorp conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** reziduurile 6 și 48 din catena lungă compozită corespund suplimentar reziduurilor din anticorpul donor.

4. Moleculă anticorp conform revendicării 1 sau 3, **caracterizată prin aceea că** reziduurile 71, 73 și 79 din catena lungă compozită corespund suplimentar reziduurilor echivalente din anticorpul donor.

5. Moleculă anticorp conform cu oricare dintre revendicările de la 1 până la 4, **caracterizată prin aceea că** oricare din toate combinațiile reziduurilor 57, 58, 60, 88 și 91 din catena lungă compozită corespund reziduurilor echivalente din anticorpul donor.

6. Moleculă anticorp conform cu oricare dintre revendicările de la 1 până la 5, **caracterizată prin aceea că** reziduul acceptor din catena lungă compozită corespunde reziduurilor echivalente din catena lungă KOL umană, așa cum se arată în fig. 5.

7. Moleculă anticorp conform cu oricare dintre revendicările de la 1 până la 6, **caracterizată prin aceea că**, catena scurtă complementară este o catena scurtă compozită, în care în domeniul variabil al acestei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant de la un prim anticorp (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece (donor) așa cum se arată în fig. 4. 1315

8. Moleculă anticorp, capabilă să se lege la antigena CD4, care conține o catenă scurtă compozită și o catenă lungă complementară, **caracterizată prin aceea că**, în domeniul variabil al numitei catene scurte compozite, regiunile cadru sunt derivate predominant dintr-un anticorp uman (acceptor) și cel puțin reziduurile 24 până la 34, 49 până la 56 și 89 până la 97, conform cu sistemul de numerotare Kabat, corespund reziduurilor echivalente dintr-un anticorp OKT4A monoclonal de șoarece(donor) așa cum se arată în fig. 4. 1320 1325

9. Moleculă anticorp conform revendicării 7 sau 8, **caracterizată prin aceea că** reziduul 89 din catena scurtă compozită corespunde suplimentar reziduului echivalent din anticorpul donor.

10. Moleculă anticorp conform cu oricare dintre revendicările de la 7 până la 9, **caracterizată prin aceea că** reziduurile acceptoare din catena scurtă compozită corespund reziduurilor echivalente din catena scurtă REI umană, așa cum se arată în fig. 6. 1330

11. Moleculă anticorp, onform cu oricare dintre revendicările de la 1 până la 10, **caracterizată prin aceea că** are o afinitate pentru antigena CD4 de la $10^5.M^{-1}$ până la $10^{12}.M^{-1}$. 1335

12. Moleculă anticorp, nform revendicării 11, **caracterizată prin aceea că** are o afinitate pentru antigena CD4 de cel puțin $10^8.M^{-1}$.

13. Moleculă anticorp,conform revendicărilor 11 sau 12, **caracterizată prin aceea că** are o afinitate pentru antigena CD4 similară cu cea a OKT4A.

14. Moleculă anticorp, conform cu oricare dintre revendicările de la 1 la 13, **caracterizată prin aceea că** este o Ig completă. 1340

15. Moleculă anticorp, conform revendicării 14, **caracterizată prin aceea că** este izotip IgG₄.

16. Moleculă anticorp, conform revendicării 14 sau 15, **caracterizată prin aceea că** unul sau mai multe reziduuri din domeniile constante ale Ig au fost modificate în scopul alterării funcțiunilor efectoare ale domeniilor constante. 1345

17. Moleculă anticorp, conform cu oricare dintre revendicările de la 1 până la 16, **caracterizată prin aceea că** este obținută prin utilizarea tehnologiei ADN recambinante.

18. Moleculă anticorp, conform cu oricare dintre revendicările de la 1 la 17, **caracterizată prin aceea că** se utlizează în terapie, și anume în tratamentul respingerilor de grefă sau în tratameentul tulburărilor celulelor T helper. 1350

19. Secvență de nucleotide, **caracterizată prin aceea că**, codifică o catenă de anticorp compozită, așa cum aceasta este definită în oricare dintre revendicările de la 1 până la 10 și este prezentată în fig. 1 și fig. 2.

20. Metodă pentru tratamentul respingerii unei grefe sau a unei afecțiuni a celulei T helper, **caracterizată prin aceea că** intervenția asupra organismului viu se realizează 1355

1360 direct cu un anticorp grefat CDR conform revendicării 1, împreună cu un purtător sau suport acceptabile din punct de vedere farmaceutic, administrat pe căi convenționale, într-o doză zilnică de 0,004 până la 5 mg/kilocorp, de preferință de la 0,05 până la 2 mg/kilocorp.

21. Procedeu pentru prepararea unei molecule anticorp capabile să se lege la antigena CD4, **caracterizat prin aceea că** cuprinde:

1365 a) furnizarea unei prime secvențe ADN, care codifică o catenă lungă compozită așa cum aceasta este definită în oricare dintre revendicările de la 1 până la 5 sau o catenă scurtă compozită așa cum aceasta este definită în oricare dintre revendicările de la 7 până la 10, sub controlul elementelor corespunzătoare din partea superioară și inferioară;

b) transformarea celulei gazdă cu prima secvență ADN; și

1370 c) cultivarea celulei gazdă transformate astfel încât să se producă o moleculă anticorp conform cu oricare dintre revendicările de la 1a 1 până la 1a 17.

22. Procedeu conform revendicării 21, **caracterizat prin aceea că** mai cuprinde:

a) furnizarea unei a doua secvențe ADN, care codifică o catenă scurtă sau lungă de anticorp complementară fără de prima catenă, sub controlul elementelor corespunzătoare din partea superioară și inferioară; și

1375 b) transformarea celulei gazdă atât cu prima cât și cu cea de a doua secvență ADN.

23. Procedeu conform revendicării 22, **caracterizat prin aceea că** cea de a doua secvență ADN codifică o catenă de anticorp compozită.

1380 24. Procedeu conform revendicării 22 sau 23, **caracterizat prin aceea că** prima și a doua secvență ADN sunt prezente în același vector.

25. Procedeu conform revendicării 24, **caracterizat prin aceea că** secvențele sunt sub controlul acelorași elemente superioare și/sau inferioare.

26. Procedeu conform revendicării 24, **caracterizată prin aceea că** secvențele sunt sub controlul unor elemente superioare și/sau inferioare diferite.

1385 27. Procedeu conform revendicării 22 sau 23, **caracterizat prin aceea că** prima și a doua secvențe ADN sunt prezente în vectori diferiți.

28. Procedeu conform cu oricare dintre revendicările de la 21 până la 27, **caracterizat prin aceea că** celula gazdă este o celulă CHO.

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

Examinator: **farm. Pentelescu Elena**

RO 114980 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

Secvența nucleotidică regiunii variabile a catenei lungi DKT4A

```
1  AATTCCTGG AATCGATTCC CAGTTCCTCA CATTAGTCA GCACTGAACA
51  CGGACCCCTC ACC
      <START translation>
      ATGAACT CCGGGCTCAG CCTGATTTTC CTGTCTCTTG
101  TTTTAAAAGG TGTCCAATGT
      <START frwk1>
      GAAGTGATTC TGGTGGAGTC TGGGGGAGCC
151  TTAGTGGAGC CTGGAGGGTC CCTGAACTC TCCTGTTTCA CCTCT
      <START cdr1>
      GGATT
201  CACTTTCAGT AACTAT
      <START frwk2>
      GCCA TGTCTTGGGT TCGTCAGACT CCGGAGAAGA
251  GGCTGGAGTG GGTGCGA
      <START cdr2>
      GCC ATTAGTGATC ATAGTACTAA C
      <START frwk3>
      ACCTACTAT
301  CCAGACAGTG TGAAGGGGCG ATTCAGTATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA
351  CACCCTGTAC CTACAAATGA ACAGTCTGAG GTCTGAGGAC ACGGCCATTT
401  ATTACTGTGA AAGA
      <START cdr3>
      AAGTAC GGTGGTGACT ACGACCCCTT T
      <START frwk4>
      GACTATTGG
451  GGCCAAGGCA CCACTCTCAC AGTCTCCTCA
      <START CONSTANT>
      GCCAAAACAA CAGCCCCATC
501  GGTCTATCCA CTGGCCCCTG TGTGTGGAGA TACAACTGGC TCCTCGGTGA
551  CTCTAGGATG C
```

Fig. 1

Secvența nucleotidică regiunii variabile a catenei scurte OKT4A

```

1  GAATTCGGT GTAGAA
    <START translation<
    ATGA GACCGTCTAT TCAGTTCCTG GGGCTCTTGT
51  TGTTCCTGGCT TCATGGT
    <START poorly sequenced region<
    GxC TSAkGTGTGt AkGAYMTCYA GATGUhwrCA
101 GTCTChAkbc
    <START FRWK1<
    TCACTGTCTG CATCTCTGGG AGGCAAAGTC ACCATCGCTT
151 GCAAGGCA
    <START cdr1<
    AG CCAAGACATT AACAACTAT
    <START FRWK2<
    A TAGCTTGGA CCAACACAAG
201 CCTGGAAAAG GTCCTAGGCT ACTCATTCTAT
    <START cdr2<
    TACACATCTA CATTACAACC
251 A
    <START FRWK3<
    GGCATCCCA TCAAGGTTCA GTGGAAGTGG ATCTGGGAGA GATTATTCTT
301 TCAGCATCAG CAACCTGGAG CCTGAAGATA TTGCAACTTA TTATTGTCTA
351 CAG
    <START cdr3<
    TATGATA ATCTTCTGTT C
    <START FRWK4<
    ACGTTCGGA GGGGGGACCA AACTGGAAAT
401 AAA
    <START constant region<
    CGGGCT GATGCTGCAC CAACTGTATC CATCTTCCCA CCABSAGTGA
451 GCAGTTAACA TCTGGAGG

```

Fig. 2

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

Secvența peptidei cu catenă lungă OKT4A murinică (regiunea variabilă)

	20	35ab
MU OKT4A	EVILVESGGA IVEPGGSLKL SCSASGTFPS NYAMS--WVR	
	52abc	65
MU OKT4A	QTPEKRLEWV AAISD--HST NTYYEDSVKG RFTISRDNK	
	82abc	95 100c
MU OKT4A	NTLYLQMNSL RSEDTAIYYC AR-KYGGD-Y DPE-----D	
	113	
MU OKT4A	YWGQGTTLV SS	

Fig. 3

Secvența peptidei cu catenă scurtă OKT4A murinică (regiunea variabilă)

	20	40	60
MU OKT4A	DIQMTQSPSS LSASLGKVT IACKASODIN NYIAWYQHKP GKGPRLLIYH TSTLQPGIPS		
	80	100	
MU OKT4A	RFSGSGSGRD YSFISNLEP EDIATYYCIQ YNDLFTTFGG GTKLEIKR		

Fig. 4

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

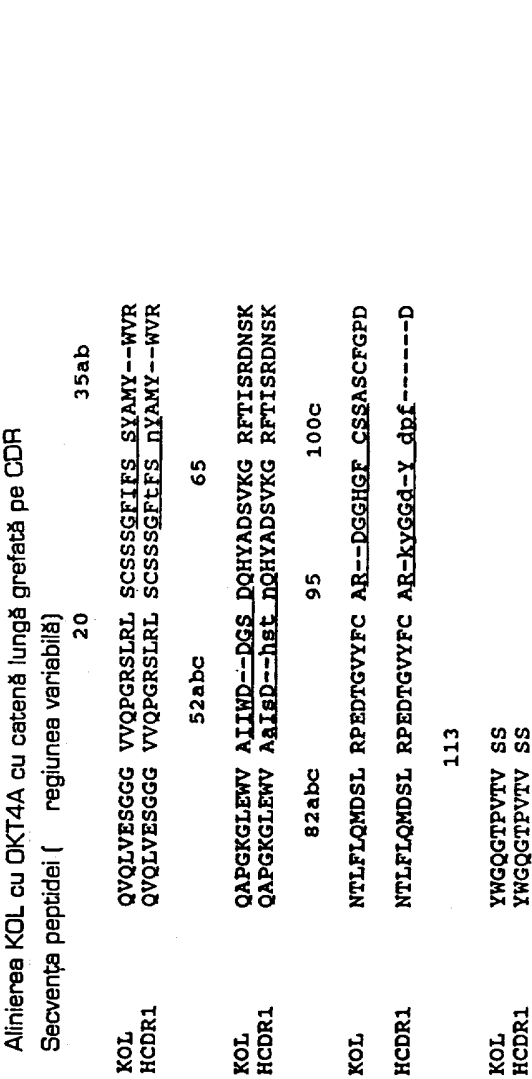


Fig. 5

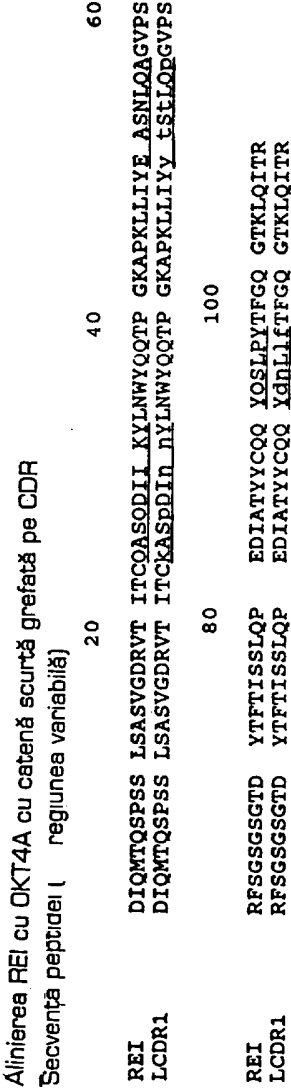


Fig. 6

Secvența ADN și translația proteinei catenei lungi, grefate pe CDR

```

10      20      30      40      50
AATTC GCGC CACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTT CTC TCA GTA
TTAAG CGCG GTGG TAC CTT ACC TCG ACC AAA GAG AAG AAG GAC AGT CAT
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val>
a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a >

60      70      80      90      100
ACT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GTC
TGA TGT CCA CAG GTG AGG GTC CAA GTC GAC CAC CTC AGA CCT CCT CAG
Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a >

110     120     130     140     150
GTC CAG CCT GGA AGG TCC CTG AGA CTG TCT TGT TCT TCT GGA TTC ACT
CAG GTC GGA CCT TCC AGG GAC TCT GAC AGA ACA AGA AGA CCT AAG TGA
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly phe Thr>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a >

160     170     180     190     200
TTC AGT AAC TAT GCT ATG TAC TGG GTC AGA CAG GCT CCT GGA AAG GGA CTC
AAG TCA TTG ATA CGA TAC ATG ACC CAG TCT GTC CGA CGA CCT TTC CCT GAG
Phe Ser Asn Tyr Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a >

210     220     230     240     250
GAG TGG GTC GCT GCC ATT AGT GAT CAT AGT ACT AAC CAG CAC TAC GCT GAC
CTC ACC CAG CGA CGG TAA TCA CTA GTA TCA TGA TTG GTC GTG ATG CGA CTG
Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Asp His Ser Thr Asn Gln His Tyr Ala Asp>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a >

260     270     280     290     300
TCT GTC AAG GGA AGA TTC ACA ATT TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACA CTG
AGA CAG TTC CCT TCT AAG TGT TAA AGA TCT CTG TTG AGA TTC TTA TGT GAC
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a >

```

Fig. 7(i)

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

```

310   TTC CTG CAG ATG GAC TCA CTC AGA CCT GAG GAC ACA GGA GTC TAC TTC TGT
      AAG GAC GTC TAC CTG AGT GAG TCT GGA CTC CTG TGT CCT CAG ATG AAG ACA
      Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys>
      a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
      320   330   340   350
360   GCT AGA AAG TAC GGT GGT GAC TAC GAC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGT
      CGA TCT TTC ATG CCA CCA CTG ATG CTG GGG AAA CTG ATG ACC CCG GTT CCA
      Ala Arg Lys Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly>
      a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
      370   380   390   400   410
>SEQED (include) of: ja91.ins check: 5694 from: 1 to: 2153
      420   430   440   450   460
      ACC CCG GTC ACC GTG AGC TCA GCT TCC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC
      TGG GGC CAG TGG CAC TCG AGT CGA AGG TGG TTC CCG GGT AGG CAG AAG GGG
      Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro>
      a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
      470   480   490   500   510
      CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
      GAC CGC GGC ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
      Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys>
      a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
      520   530   540   550   560
      CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC
      GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG
      Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly>
      a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
      570   580   590   600   610
      GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA
      CCG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT
      Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly>
      a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ

```

Fig. 7(ii)

```

620 CTC TAC TCC AGC AGC GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TCG AAC CCG TGC 660
GAG ATG AGG GAG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC
Leu Tyr Ser Leu Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a a a >

670 AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AGC GTG GAC 710
TTC TGG ATG TGG ACG TTG CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG
Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp>
a a a a Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG a a a a a a >

720 AAG AGA GTT GG TGA GAGGC CAGCA CAGGG AGGGA GGGTG TCTGC TGGAA GCCAG 770
TTC TCT CAA CC ACT CTCCG GTGGT GTCCC TCCCT CCCAC AGACG ACCTT CGGTC
Lys Arg Val Gly>
a a a a >

780 GGTCA GCCCT CCTGC CTGGA CGCAC CCCGG CTGTG CAGCC CCAGC CCAGG GCAGC 820
CGAGT CGGGA GGACG GACCT GCGTG GGGCC GACAC GTCCG GGTCC GGTCC CGTCG

830 AAGGC ATGCC CCATC TGTCT CCTCA CCCGG AGGCC TCTGA CCACC CCACT CATGC 880
TTCCG TACGG GGTAG ACAGA GGAGT GGGCC TCCGG AGACT GGTGG GTGTA GTACG

890 TCAGG GAGAG GGTCT TCTGG ATTTT TCCAC CAGGC TCCCG GCACC ACAGG CTGGA 930
AGTCC CTCTC CCAGA AGACC TAAAA AGGTG GTCCG AGGGC CGTGG TGTCC GACCT

940 TGCCC CTACC CCAGG CCCTG CGCAT ACAGG GCAGG TGCTG CGCTC AGACC TGCCA 990
ACGGG GATGG GGTCC GGGAC CCGTA TGTCG CGTCC ACGAC GCGAG TCTGG ACGGT

```

Fig. 7(iii)

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

```

1000      1010      1020      1030      1040
AGAGC CATAT CCGGG AGGAC CCTGC CCCTG ACCTA AGCCC ACCCC AAAGG CCAAA
TCTCG GTATA GGCCC TCCTG GGACG GGGAT TCGGG TGGGG TTTCC GGTTC

1050      1060      1070      1080      1090      1100
CTCTC CACTC CCTCA GCTCA GACAC CTTCT CTCCT CCCAG ATCTG AGTAA CTCCC
GAGAG GTGAG GGAGT CGAGT CTGTG GAAGA GAGGA GGGTC TAGAC TCATT GAGGG

1110      1120      1130      1140      1150
AATCT TCTCT CTGCA GA G TCC AAA TAT GGT CCC CCA TCA TGC CCA GG
TTAGA AGAGA GACGT CT C AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT AGT ACG GGT CC
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Cys Pro Ser Cys Pro Gly>
b b Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ b b >

1160      1170      1180      1190      1200      1210
TA AGCCA ACCCA GGCCT CGCCC TCCAG CTCAG GCGGG GACAG GTGCC CTAGA GTAGC
AT TCGGT TGGGT CCGGA GCGGG AGGTC GAGTT CGGCC CTGTC CACGG GATCT CATCG

1220      1230      1240      1250      1260
CTGCA TCCAG GGACA GGCCC CAGCC GGCTG CTGAC GCATC CACCT CCATC TCCTC
GACGT AGGTC CCTGT CCGGG GTCGG CCCAC GACTG CGTAG GTGGA GGTAG AGAAG

1270      1280      1290      1300      1310
CTCAG C A CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA
GAGTC G T GGA CTC AAG GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT
Pro Glu Phe Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys>
c c c c Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ c c c c >

1320      1330      1340      1350      1360
CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG
GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val>
c c c c Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ c c c c >

```

Fig. 7(iv)

```

1370      1380      1390      1400      1410
GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT
CAC CTG CAC TCG CTC CTT CTG GGG CTC CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Phe Asn Trp Tyr Val Asp>
c c c c Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
1420      1430      1440      1450      1460      1470
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC
CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CGT CTC GTC AAG TTG
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Phe Asn>
c c c c Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
1480      1490      1500      1510      1520
AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG
TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu>
c c c c Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
1530      1540      1550      1560      1570
ACC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC
TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC AGG AGG
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser>
c c c c Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEQ
1580      1590      1600      1610      1620
ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA G GTGGG ACCCA CGGGA TCGGA GGGCC
TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT C CACCC TGGGT GCGCC ACGCT CCGGG
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>
Mutare pe HCDR1 - IGG4.SE
1630      1640      1650      1660      1670      1680
ACACG GACAG AGGCC AGCTC GGCCC ACCCT CTGCC CTGGG AGTGA CCGCT GTGCC
TGTGC CTGTC TCCGG TCGAG CCGGG TGGGA GACGG GACCC TCACT GCGGA CACGG

```

Fig. 7(v)

1690 1700 1710 1720 1730
 AACCT CTGTC CCTAC AGG GCA GCC CGG TCT CCA CAT GTG GCA GCC CCC
 TTGGA GACAG GCATG TCC CGT GGC TCT CGG TGT CCA CAT GTG GCA GCC GGG
 Ala Ala Pro Arg Ala Thr Gly Val His Pro Ala Pro>
 d Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG d d >
 1740 1750 1760 1770 1780
 ATC CCA GGA GGA GAT GAC CAA GAA CCA GGT CAG CCT GAC CTG CCT GGT CAA
 TAG GGT CCT CCT CTA CTG GTT CTT GGT CCA GTC GGA CTG GAC CCA GTT
 Ile Pro Gly Asp Asp Gln Glu Pro Gly Gln Pro Asp Leu Pro Gly Gln>
 d d d Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG d d d >
 1790 1800 1810 1820 1830
 AGG CTTT CTA CCC CAG CAG CAT CGC CGT GGA GTG GGA GAG CAA TGG GCA GCC
 TCC GAA GAT GGG GTC GCT GTA GCG GCA CCT CAC CCT CTC GTT ACC CGT CGG
 Arg Leu Leu Pro Gln Arg His Arg Arg Gly Val Gly Gln Trp Ala Ala>
 d d d Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG d d d >
 1840 1850 1860 1870 1880
 GGA GAA CAA CTA CAA GAC CAC GCC TCC CCT GCT GGA CTC CGA CGG CTC CTT
 CCT CTT GTT GAT GTT CTA GTC GCG AGG GCA CGA CCT GAG GCT GCC GAG GAA
 Gly Glu Gln Leu Leu Asp His Ala Ser Arg Ala Gly Leu Arg Arg Leu Leu>
 d d d Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG d d d >
 1890 1900 1910 1920 1930
 CTT CCT CTA CAG CAG GCT AAC CGT GGA CAA GAG CAG GTG GCA GGA GGG GAA
 GAA GGA GAT GTC GTC CCA TTG GCA CCT GTT CTC CTC CAC CGT CCT CCC CCT
 Leu Pro Leu Gln Gln Ala Asn Arg Gly Gln Glu Val Ala Gly Gly Glu>
 d d d Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG d d d >
 1940 1950 1960 1970 1980
 TGT CTT CTC ATG CTC CGT GAT GCA TGA GGC TCT GCA CAA CCA CTA CAC ACA
 ACA GAA GAG TAC GAG GCA CTA CCA TCT ACT CCG AGA CGT GTT GAT GTG TGT
 Cys Leu Leu Met Leu Arg Asp Ala End Gly Ser Ala Gln Pro Leu His Thr>
 d d d Mutare pe HCDR1 - IGG4.SEG d d d >

Fig. 7(vi)

1990 2000 2010 2020 2030 2040
GAA GAG CCT CTC CCT GTC TCT GGG TAA ATGA GTGCC AGGGC CGGCA AGCCC CCGCT
CTT CTC GGA GAG GGA AGA CCC ATT TACT CACGG TCCCG GCCGT TCGGG GCGGA
Glu Glu Pro Leu Pro Val Ser Gly End>
Mutare pe HCDR1 - IGG4.SE >
2050 2060 2070 2080 2090 2100
CCCCG GGCTC TCGGG GTGGC GCGAG GATGC TTGGC ACGTA CCCC GCGGT TCTAC ATACT
GGGC CCGAG AGCC CAGCG CGCTC CTACG AACCG TGCAAT GGGC AGATG TATGA
2110 2120 2130 2140 2150
TCCCA GGCAC CCAGC ATGGA AATAA AGCAC CCACC ACTGC CCTGG GCCC TGTGA
AGGCT CCGTG GGTGG TACCT TTATT TCGTG GGTGG TGACG GGACC CCGGG ACACT
2160 2170 2180 2190 2200 2210
GACTG TGATG GTTCT TTCCA CCGGT CAGGC CGAGT CTGAG GCCTG AGTGA CATGA
CTGAC ACTAC CAAGA AAGGT GCGCA GTCCG GCTCA GACTC CCGAC TCACT GTACT
2220 2230 2240 2250 2260
GGGAG GCAGA GCGGG TCCCA CTGTC CCCAC ACTGG CCCAG GCGTT GCACT GTCTC
CCCTC CGTCT CGGCC AGGCT GACAG GGGTG TGACC GGCTC CGCAA CGTCA CACAG
2270 2280 2290 2300 2310 2320
CTGGG CCACC TAGGG TGGGG CTCAG CCAGG GGCTC CCTCG GCAGG GTGGG GCATT
GACCC GGTGG ATCCC ACCCC GAGTC GGTCC CCGAG GGAGC CGTCC CACCC CGTAA
2330 2340 2350 2360
TGCCA GCGTG GGCCT CCCTC CAGCA GCAGG ACTCT AGAGG ATCC
ACGGT CGCAC CCGGA GGGAG GTCGT CGTCC TGAGA TCTCC TAGG

Fig. 7(vii)

	10	20	30	40	50
AATTC ACC ATG GGT GTG CCC ACT CAG GTC CTG GGG TTG CTG CTG TCG CTT					
TTAAG TGG TAC CCA CAC GGC TGA GTC CAG CAC CCC AAC GAC GAC GAC ACC GAA					
Met Gly Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu>					
a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ					
	60	70	80	90	100
ACA GAT GCC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCT TCT TCT TCT TCT					
TGT CTA CGG TCT ACA CTA TAG GTC TAC TGT GTC ACA GGA ACA GAC AGA					
Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser>					
a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ					
	110	120	130	140	150
GCT TCT GTC GGA GAC ACA GTC ACA ATC ACA TGT AAG GCT AGC CCA GAC AAT					
CGA AGA CAG CCT CTG TCT CAG TGT TAG TGT ACA TGC CGA TCG GGT CTG TAA					
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Pro Asp Ile>					
a a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ					
	160	170	180	190	200
AAC AAC TAT CTG AAC TGG TAC CAG CAC ACA CCT GGA AAG GCT CCT AAG CTG					
TTG TTG ATA GAC TTG ACC ATG CTG TGT GGA CCT TTC CCA GGA TTC GAC					
Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu>					
a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ					
	210	220	230	240	250
CTG ATC TAC TAC ACA TCT ACA TTA CAA CCA GGA GTC CCT TCT AGA TTC TCT					
GAC TAG ATG AGT TGT AGA TGT AAT GTT GGT CCT CAG GGA ACA TCT AAG AGA					
Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser>					
a a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ					
	260	270	280	290	300
GGT TCT GGC TCT GGA ACA GAG TAC ACA TTC ACA ATC TCT TCT CTC CAA CCT					
CCA AGA CCG AGA CCT TGT CTG ATG TGT AAG TGT TAG AGA AGA GAG GTT GGA					
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro>					
a a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ					

Fig. 8(i)

Fig. 8(ii)

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

```

570      CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG AGC CTG AGC
      GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG
      Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Thr Leu Thr Leu Ser>
      a a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ          600      610
620      AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
      TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CCG AGC CTT CAG TGG GTA GTC
      Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln>
      a a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ          650      660
670      GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AG
      CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TC
      Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys End>
      a a a a a Mutare pe LCDR1 - SEQ          700      710
720      GGACA AGTGC CCCCA CCTGC TCCTC AGTTC CAGCC TGAT
      CCTCT TCACG GGGGT GGACG AGCAG TCAAG GTCGG ACTA
      730      740      750

```

Fig. 8(iii)

Construcția catenei lungi OKT4A grefate pe CDR
Vector de expresie (Nu la scară)

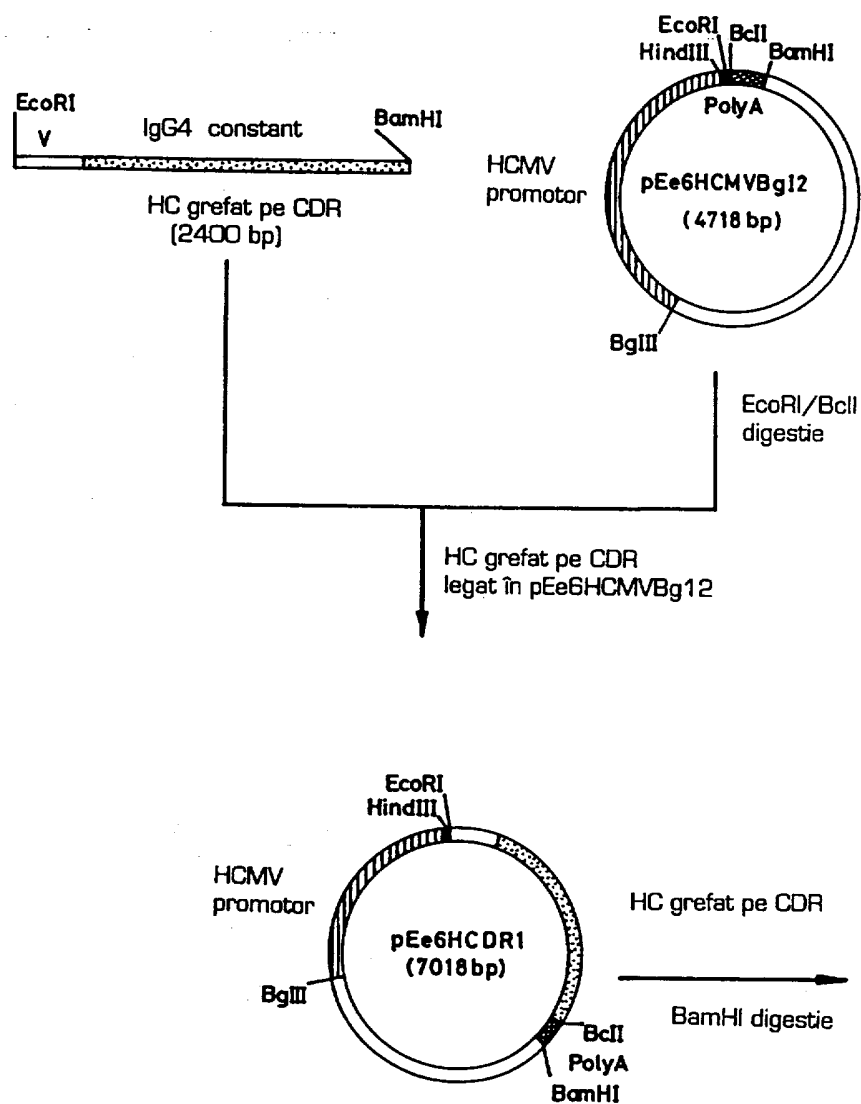


Fig. 9(i)

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

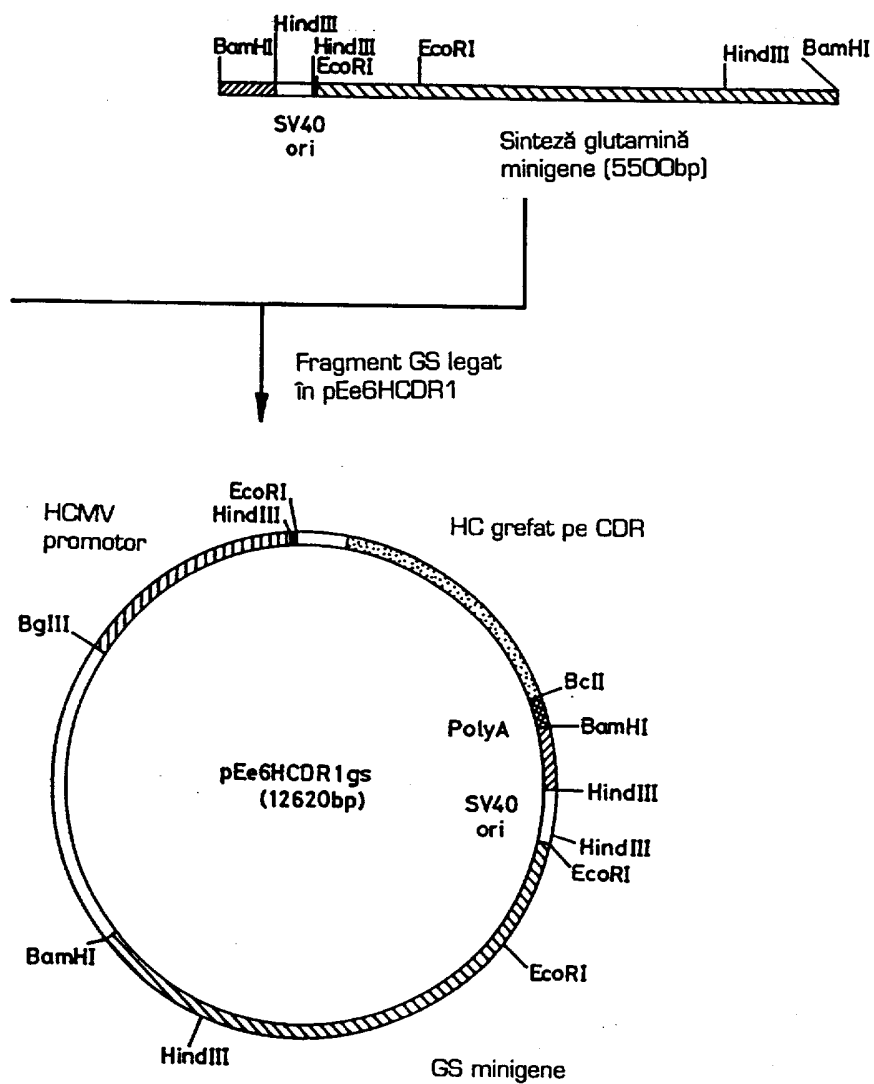


Fig. 9(ii)

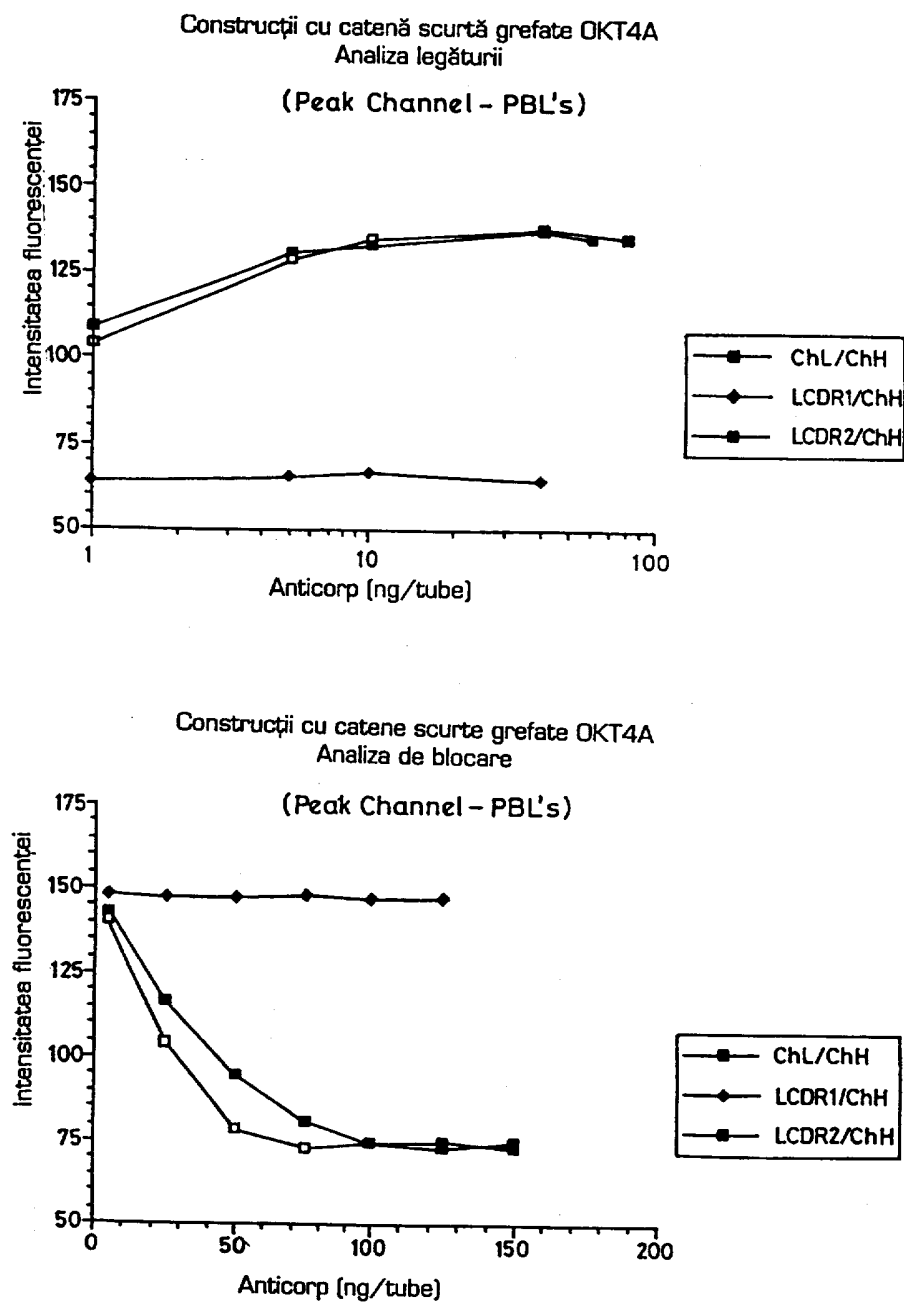


Fig. 10

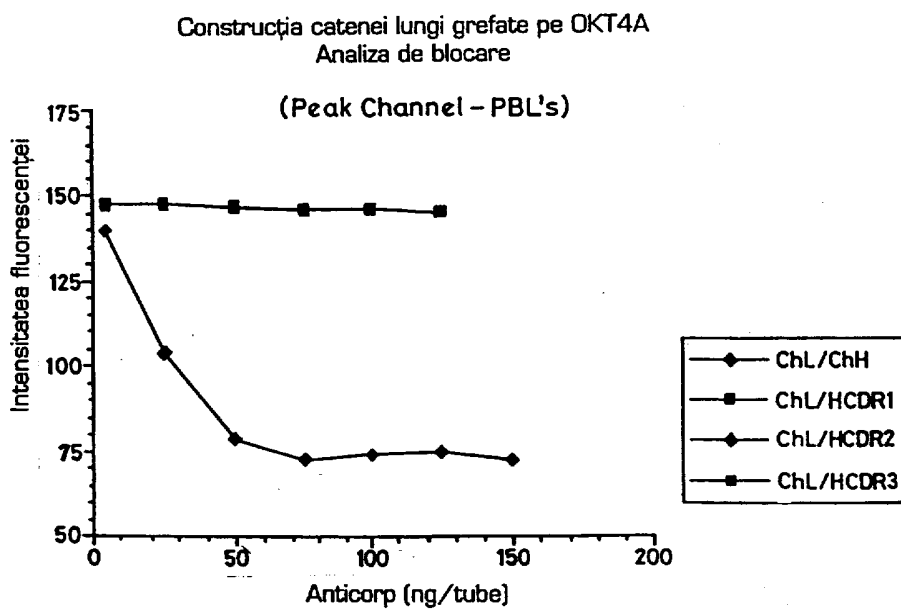
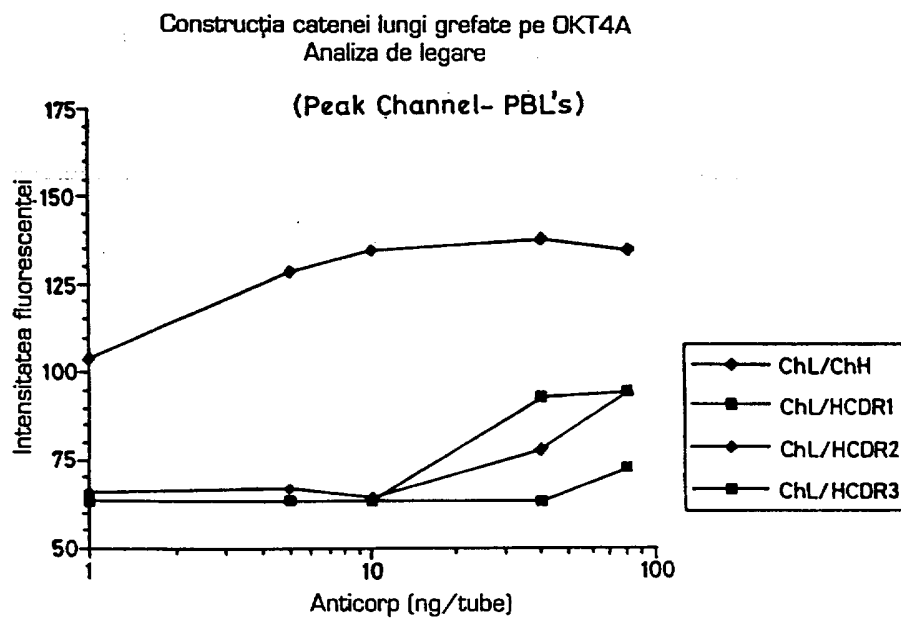


Fig. 11

	20	40	60	RESIDUE CHANGES
REI	DIQMTQSPSS	LSASVGRDVT	ITCQASODII	KYLNWYQQTP GKAPKLLIYE ASNLQAGVPS
LCDR1	DIQMTQSPSS	LSASVGRDVT	ITCKASPDIN	NYLNWYQQTP GKAPKLLIYV TSLQDGVPS
LCDR2	DIQMTQSPSS	LSASVGRDVT	ITCKASPDIN	NYIAWYQHPT GKAPKLLIHY TSLQDGVPS
MU OKT4A	DIQMTQSPSS	LSASIGGKVT	IACKASPDIN	NYIAWYQHkP GKGPRLLIHY TSLQDGIIPS
		80	100	
REI	RFSGSGSGTD	YTFTISSLQP	EDIATVYVCQ	YQSLPYTFGQ GTKLQITR
LCDR1	RFSGSGSGTD	YTFTISSLQP	EDIATVYVCQ	YDNLITTFGQ GTKLQITR
LCDR2	RFSGSGSGTD	YTFTISSLQP	EDIATVYVCQ	YDNLITTFGQ GTKLQITR
MU OKT4A	RFSGSGSGTD	YsFslSnLep	EDIATVYCLQ	YDNLITTFGQ GTKLLeIR

98

Alinierarea KOL cu OKT4A grefat pe CDR și secvența peptidică murinică
cu catenă lungă (regiunea variabilă)

	20	35ab	RESIDUE CHANGES
KOL	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS SYAMY--WVR	
HCDR1	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	
HCDR2	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	
HCDR3	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	
HCDR4	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24, 35
HCDR5	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24, 35
HCDR6	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24, 35
HCDR7	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24, 35
HCDR8	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24
HCDR9	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24, 35
HCDR10	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL SCSSSGFTFS NYAMY--WVR	24, 35
MU OKT4A	eVILVESGGa	lVePGSLkL SCSSSGFTFS NYAMg--WVR	24, 35
	52abc	65	
KOL	QAPKGLEWV	AIIND--DGS DQHYADSVKG RFTISRDNsk	
HCDR1	QAPKGLEWV	AaIsD--hst lQHYADSVKG RFTISRDNsk	57, 58
HCDR2	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	57, 58
HCDR3	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	42, 57, 58
HCDR4	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	42, 44, 57, 58
HCDR5	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	42, 57, 58, 60
HCDR6	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	42, 57, 58, 60
HCDR7	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	42, 44, 57, 58, 60
HCDR8	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	42, 44, 57, 58, 60
HCDR9	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	57, 58
HCDR10	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	57, 58, 60
MU OKT4A	QAPKGLEWV	AaIsD--hst ntyYADSVKG RFTISRDNsk	

Fig. 13(i)

(51) Int.Cl.⁶ C 12 P 21/08;
C 12 N 15/13;
A 61 K 39/395;

KOL	82abc	95	100c	
HCDR1	NTLFLQMSL	RPEDTGVYFC	AR--DGGHGF	CSSASCFGPD
HCDR2	NTLFLQMSL	RPEDTGVYFC	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR3	NTLFLQMSL	RPEDTGVYFC	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR4	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR5	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR6	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR7	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR8	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR9	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
HCDR10	NTLFLQMSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
MU OKT4A	NTLFLQMnSL	RPEDTAVYc	AR-KVGGd-Y dbf	-----D
				88, 91 88, 91 88, 91 88, 91 88, 91 88, 91 88, 91 88, 91 88, 91 88, 91
KOL	113			
HCDR1	YWGQGTPTV	SS		
HCDR2	YWGQGTPTV	SS		
HCDR3	YWGQGTPTV	SS		
HCDR4	YWGQGTPTV	SS		
HCDR5	YWGQGTPTV	SS		
HCDR6	YWGQGTPTV	SS		
HCDR7	YWGQGTPTV	SS		
HCDR8	YWGQGTPTV	SS		
HCDR9	YWGQGTPTV	SS		
HCDR10	YWGQGTPTV	SS		
MU OKT4A	YWGQGTc1TV	SS		

Fig. 13(ii)

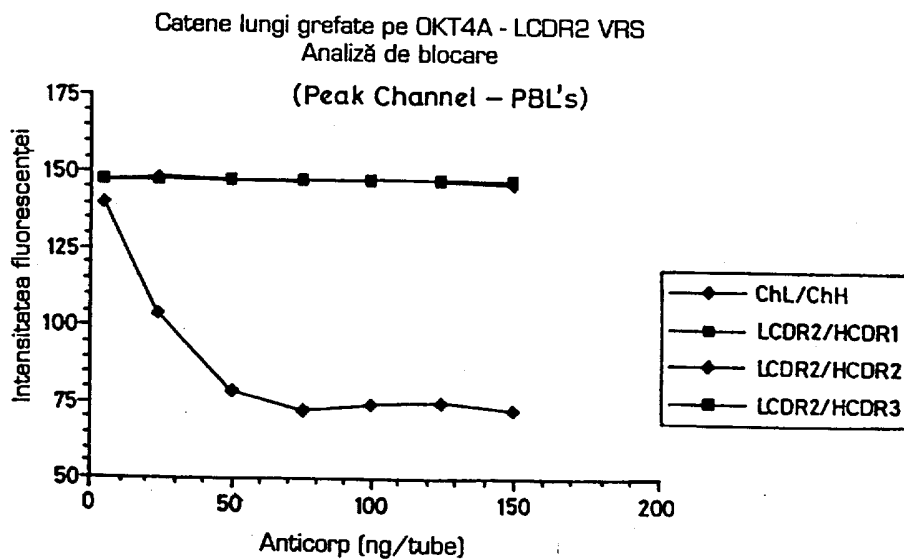
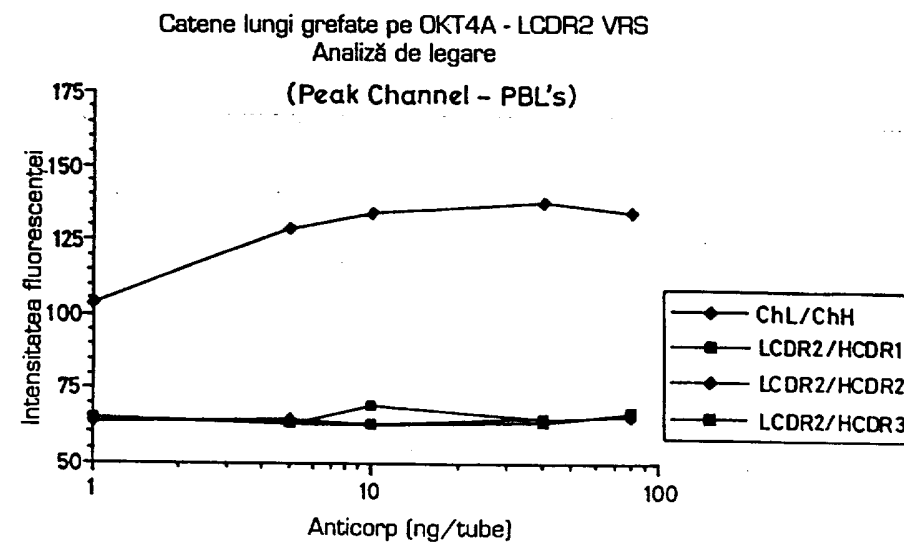


Fig. 14

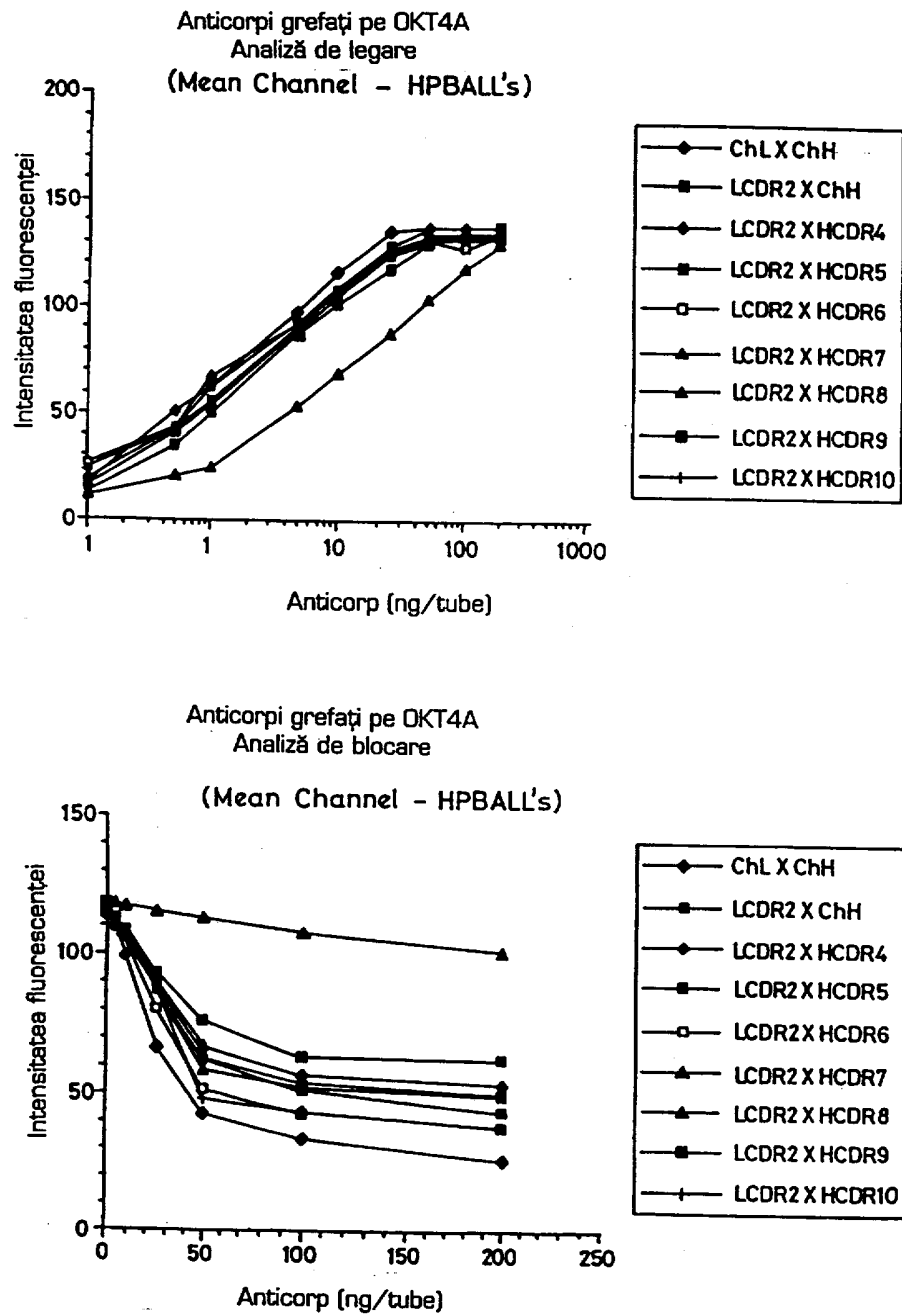


Fig. 15

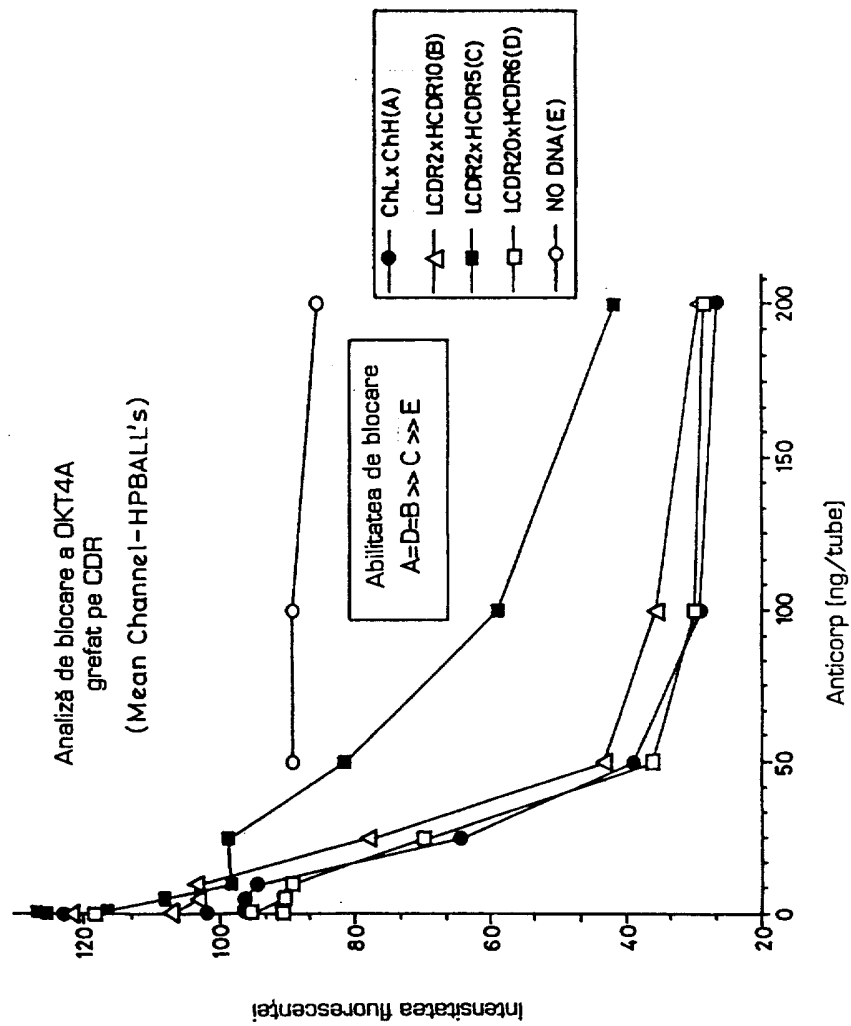


Fig. 16a

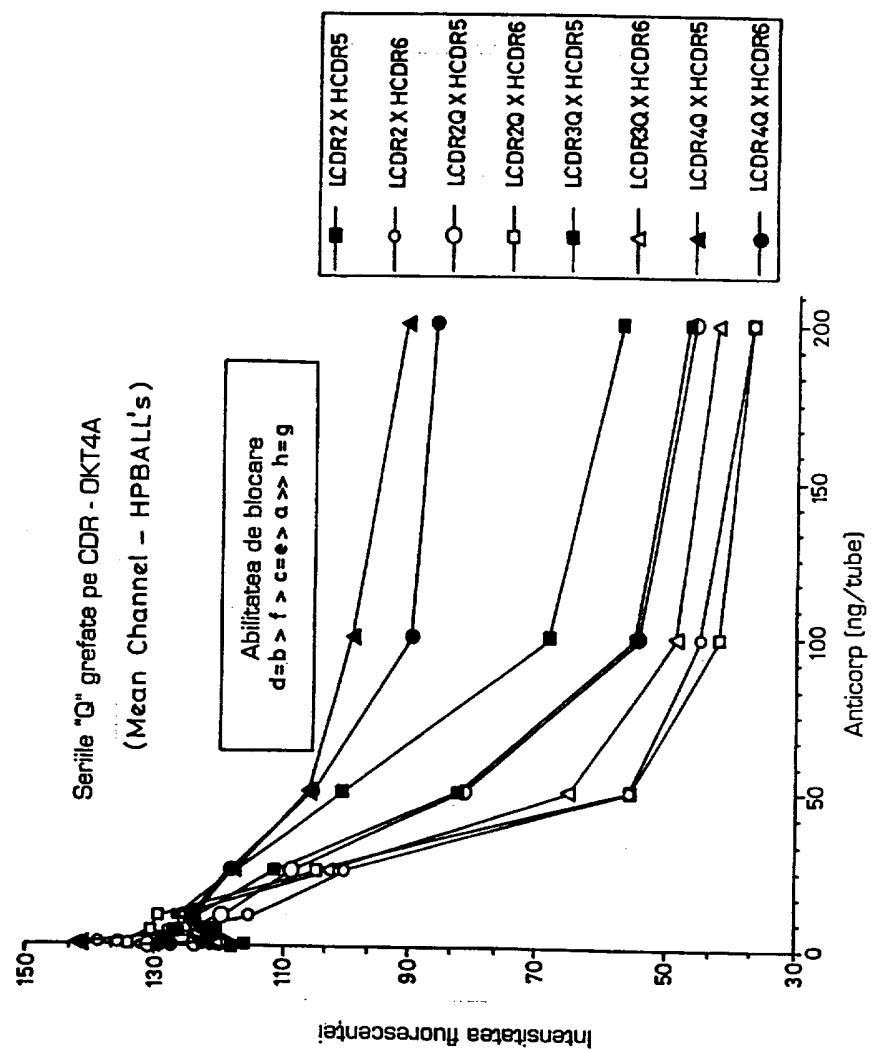


Fig. 16b

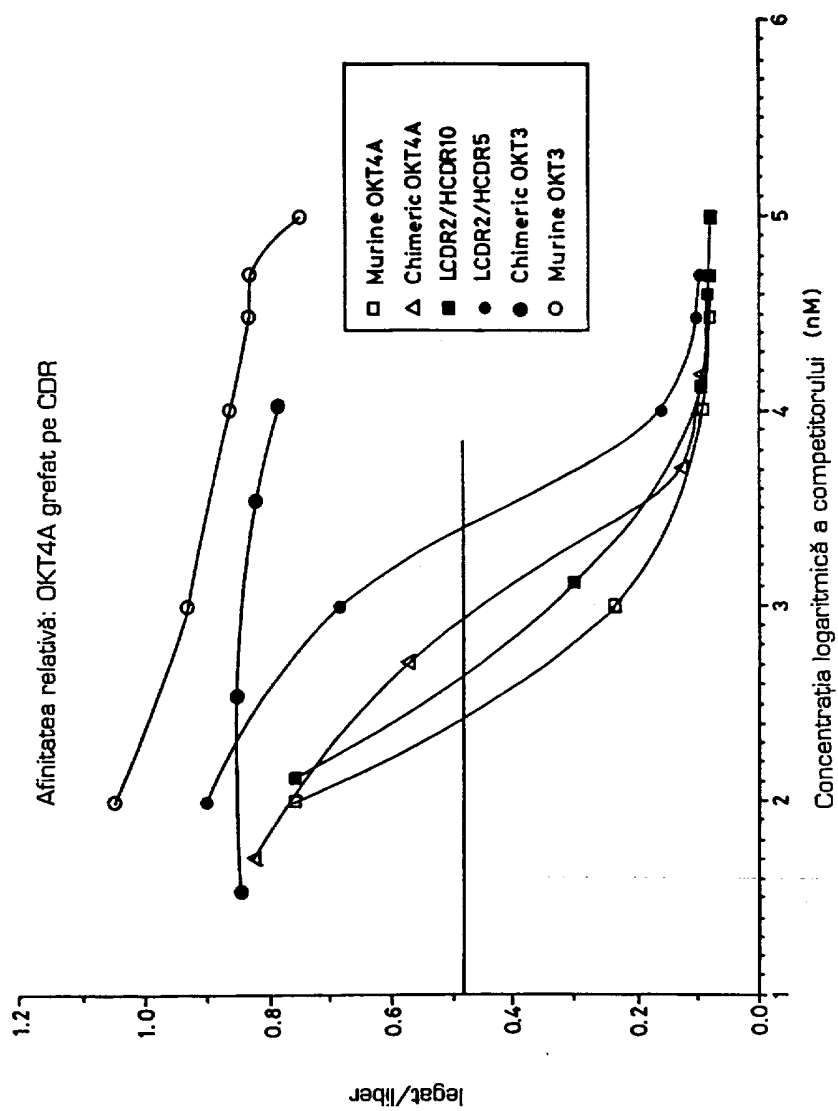


Fig. 17

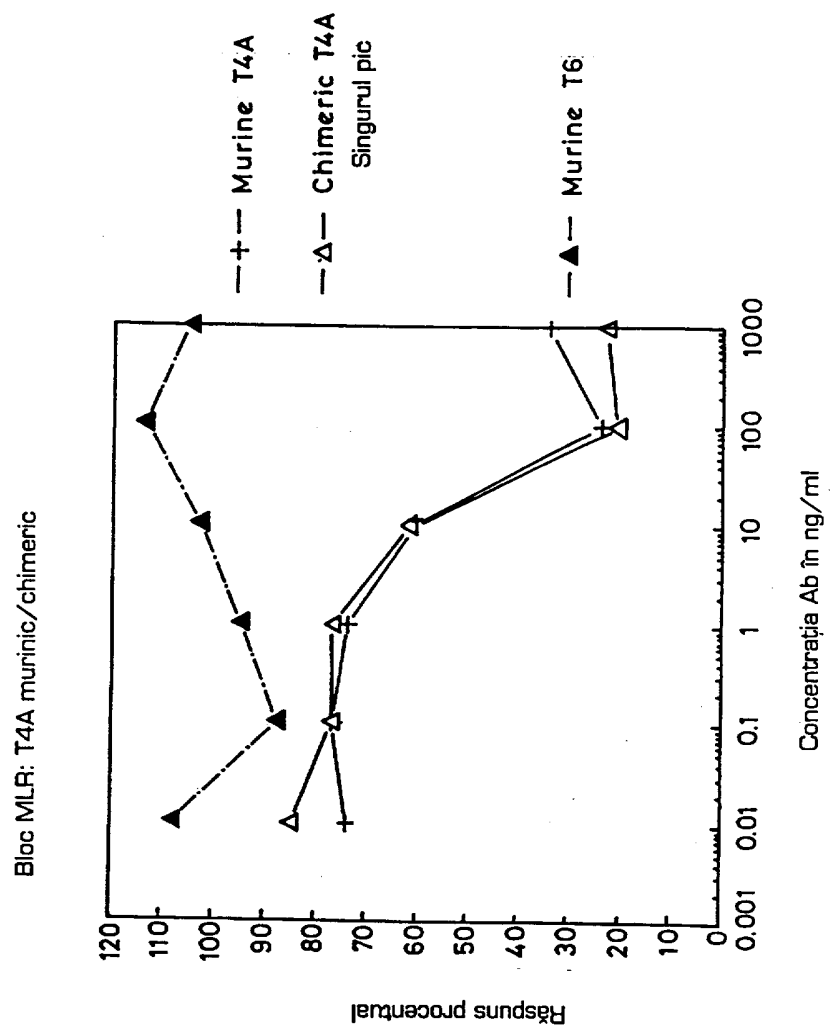


Fig. 18

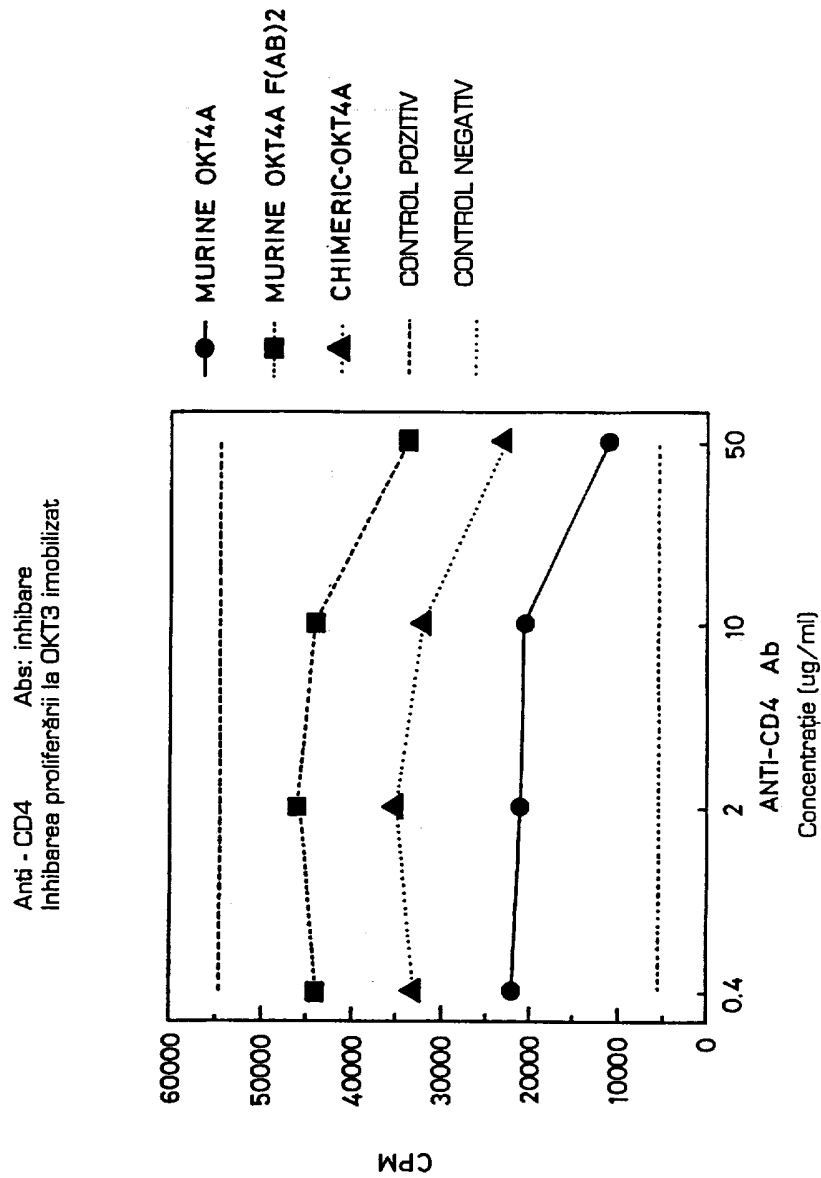


Fig. 19

