

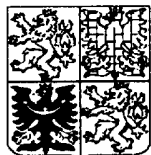
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 717

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3337-96**

(22) Přihlášeno: **04. 03. 92**

(30) Právo přednosti:
06. 03. 91 DE 91/91103389

(40) Zveřejněno: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(47) Uděleno: **08. 04. 98**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP92/00480**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/13
C 12 N 15/62
C 12 P 21/08
A 61 K 39/395
C 07 K 14/00

(73) Majitel patentu:

**MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT
BESCHRÄNKTER HAFTUNG, Darmstadt,
DE;**

(72) Původce vynálezu:

Bendig Mary M. dr., London, GB;
Kettleborough Catherine A., Watford, GB;
Saldanha José, Enfield, GB;

(74) Zástupce:

**Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
10100;**

(54) Název vynálezu:

**Chimérická monoklonální protilátka,
expresní vektory a farmaceutický
prostředek**

(57) Anotace:

Chimérická monoklonální protilátka, obsahující místa, vázající antigen, CDR, nehumánního původu, úseky základní struktury, FR, nehumánního původu a konstantní oblasti humánního imunoglobulinu, která vykazuje tyto znaky: i/ váže se k humánním receptorům EGF a inhibuje vazbu EGF k receptoru EGF, ii/ konstantní oblasti jejího těžkého řetězce zahrnují sekvenci aminokyselin humánního řetězce gamma-1 a konstantní oblasti lehkého řetězce zahrnují sekvenci aminokyselin humánního řetězce kappa, iii/ její oblasti CDR, reprezentující místa, vázající antigen, zahrnují sekvence aminokyselin, uvedené v nároku 1, iv/ její úseky základní struktury, FR, variabilní oblasti, která nemá vztah k místům, vázajícím antigen, zahrnují aminokyselinové sekvence, uvedené v nároku 1. Expresní vektor, obsahující sekvenci DNA, kódující variabilní a konstantní oblast lehkého řetězce této chimérické monoklonální protilátky, který nese označení pCVL425 a je uložen ve sbírce DSM pod přírůstkovým číslem DSM 6338. Expresní vektor, obsahující sekvenci DNA, kódující variabilní a konstantní oblast těžkého řetězce této

chimérické monoklonální protilátky, který nese označení pCVH425 a je uložen ve sbírce DSM pod přírůstkovým číslem DSM 6337. Farmaceutický prostředek, obsahující tuto chimérickou monoklonální protilátku. Výše uvedené protilátky se používá k terapeutickým a diagnostickým účelům při léčení nádorů.

CZ 283 717 B6

Chimérická monoklonální protilátka, expresní vektory a farmaceutický prostředek

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká nových chimérických monoklonálních protilátek, které obsahují umělou modifikovanou konvenční sekvenci, přinejmenším úseků základní struktury ve variabilní oblasti těžkého řetězce humánních imunoglobulinů.
- 10 Vynález se dále týká chimérických monoklonálních protilátek, které se vážou k epitopům epidermálního růstového faktoru. Vynález zveřejňuje sekvence aminokyselin odpovídajícího místa, vázajícího antigen pro tento receptor.
- 15 Dále se vynález týká farmaceutických přípravků, které obsahují tyto protilátky. Tyto farmaceutické přípravky se hodí pro léčbu nádorů, jako jsou melanomy, gliomy a karcinomy. Protilátek podle vynálezu je také možno používat při diagnostických aplikacích, při nichž se zjišťuje povaha a umístění těchto nádorů in vitro nebo in vivo.
- V popisu se používá několika technických termínů, které budou nyní vysvětleny:
- 20 Pod pojmem „humanizované“ protilátky se rozumějí protilátky, které obsahují úseky základní struktury variabilních oblastí a konstantních oblastí aminokyselin, umístěných v lehkém a těžkém řetězci, které pocházejí z humánních zdrojů. Naproti tomu, jejich hypervariabilní oblasti pocházejí z nehumánních zdrojů.
- 25 Pod pojmem „chimérické“ protilátky se rozumějí protilátky, obsahující variabilní a hyper-variabilní oblasti, které pocházejí z nehumánních zdrojů, zatímco jejich konstantní oblasti jsou humánního původu.
- 30 Úseky základní struktury protilátky jsou v dalším textu označovány zkratkou FRs (framework regions). FRs se nacházejí ve variabilních oblastech. V těchto oblastech dochází k určité alteraci aminokyselin.
- 35 Zkratkou CDRs (complementarity determining regions) se označují oblasti, určující komplementaritu či „hypervariabilní“ oblasti protilátky. CDRs se nalézají ve variabilních oblastech. Tyto oblasti představují specifické místo vázající antigen a vykazují nesmírně velkou výměnu aminokyselin CDRs jsou především zodpovědné za vazebnou afinitu antigenu.
- 40 Pod pojmem „konvenční sekvence“ se rozumí sekvence aminokyselin, která se nevyskytuje v přírodě, jako variabilní oblasti lehkého nebo těžkého řetězce. Konvenční sekvence se používá jako náhrady za původně přítomné variabilní oblasti nehumánního těžkého nebo lehkého řetězce. Konvenční sekvence je syntetická a jedná se tedy o umělou sekvenci nejběžnějších aminokyselin určité třídy nebo podtřídy, či podskupiny těžkých nebo lehkých řetězců humánních imunoglobulinů.
- 45 Zkratkou „EGF“ se označuje epidermální růstový faktor a zkratkou „EGFR“ se označuje receptor epidermálního růstového faktoru.
- Pod pojmem „V_L“ oblasti se rozumějí variabilní oblasti lehkého řetězce.
- 50 Pod pojmem „V_H“ oblasti se rozumějí variabilní oblasti těžkého řetězce.

Dosavadní stav techniky

- Monoklonální protilátka z Muridae 425 (Mab 425) byla vypěstována proti humánní buněčné linii karcinomu A431 a zjistilo se, že se váže k polypeptidovému epitopu na vnější doméně receptoru humánního epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tato protilátka inhibuje vazbu epidermálního růstového faktoru (EGF) na místech EGFR jak s nízkou, tak s vysokou afinitou (Murthy a další (1987), Arch. Biochem. Biophys. 252, 549). Ke zvýšené expresi EGFR dochází u maligní tkáně různého původu, což činí z Mab 425 možnou látku pro diagnostiku a léčbu humánních nádorů. Skutečně se zjistilo, že Mab 425 vykazuje cytotoxicitu vůči nádorům in vitro a potlačuje růst nádorových buněk z buněčných linií, odvozených od epidermoidního a colorektálního karcinomu in vitro (Rodeck a další (1987), Cancer Res. 47, 3 692). Také bylo prokázáno, že se Mab 425, značená radioizotopem, váže ke xenoroubům humánních maligních gliomů u myši (Takahashi a další (1987), Cancer Res. 47, 3 847).
- EGF je polypeptidovým hormonem, který je mitogenní pro epidermální a epithelové buňky. Při interakci EGF se senzitivními buňkami dochází k jeho vazbě na membránové receptory; komplexy receptor–EGF se shlukují a potom jsou pojmuty do endocytotických váčků. Tím dochází k úkazu, označovanému termínem regulace směrem dolů („down–regulation“). Vazba EGF indukuje tyrosin kinázovou aktivitu receptorové molekuly a indukuje syntézu DNA.
- Receptor EGF je transmembránovým glykoproteinem o velikosti přibližně 170 000 Dalton (Cohen (1982), J. Biol. Chem. 258, 1523). Je genovým produktem c–erb–B proto–onkogenu (Downward a další, Nature, sv. 307, strana 521 až 527, 1984). Tento receptor se vyskytuje ve dvou kinetických formách, které jsou označovány jako receptor s nízkou afinitou a receptor s vysokou afinitou.
- Buněčná linie karcinomu A431 exprimuje na povrchu svých buněk velké množství receptorů EGF, a proto jí bylo použito při mnoha studiích pro tvorbu protilátek anti–EGF–receptor. Receptory na A 431 se však liší od receptorů na jiných typech buněk v uhlovodíkových zbytcích, které jsou připojeny k polypeptidu. Mnohé protilátky, vypěstované proti membránám A431, jsou proto zaměřeny proti uhlovodíkům, které nejsou společné pro všechny formy receptorových molekul (viz například Schreiber (1983) J. Biol. Chem., 258, 846).
- Jiné molekulární protilátky jsou reaktivní vůči proteinovému zbytku receptorů EGF. Při vazbě k receptorům EGF vykazují tyto protilátky různé vlastnosti, o nichž se předpokládá, že jsou závislé na konkrétní části vázané receptorové molekuly a na izotypu protilátky. Některé protilátky napodobují některé účinky EGF (agonisty) a některé tyto účinky inhibují (antagonisty).
- V průběhu růstu nádoru se předpokládá exprese receptorů EGF. Zjistilo se, že gen pro tyto receptory je buněčným analogem ptačího virového onkogenu v–erb–B (Ulrych a další (1984), Nature, 309, 418). Kromě toho bylo nalezeno spojení mezi pozdními stadii vývoje melanomu a kopiemi, navíc chromozomu, nesoucího receptorový gen (Koprowski a další, Somatic Cell and Molecular Genetics, sv. 11, str. 297 až 302, 1985).
- Jelikož receptory EGF jsou exprimovány v celé řadě tuhých nádorů, poskytují vhodný cíl pro protinádorovou léčbu. Existuje však nutnost nalézt vhodnou protireceptorovou protilátku. Mnohé ze známých protilátek mají vlastnosti, které by při jejich použití jako protinádorových činidel byly škodlivé. Tak například protilátky, které napodobují účinky EGF, by mohly stimulovat růst nádorů, místo aby jej zastavovaly. Jiné protilátky, které se vážou k receptorům s vysokou nebo nízkou afinitou, by mohly mít účinnost nižší, než je účinnost optimální, poněvadž EGF by ještě mohl projevovat svůj účinek prostřednictvím nevázaných receptorů. Ještě další protilátky mění receptory s nízkou afinitou na receptory s vysokou afinitou, což by mohlo mít za následek

výrazné posílení růstu nádoru namísto jeho inhibice. Existuje tedy v tomto oboru potřeba nalézt protilátku proti receptoru EGF, která by byla vhodná pro protinádorovou léčbu.

Protilátek MAb (z Muridae) se sice používalo pro léčbu lidí, vyvolávaly však imunologickou odpověď (Giorgi a další, (1983) Transplant. Proc. 15, 639; Jaffers a další, (1986), Transplantation 41, 572). Pro překonání tohoto problému se několik skupin snažilo „humanizovat“ protilátky z Muridae. Přitom lze použít dvou přístupů. Jednak lze domény z konstantních oblastí jak v lehkém, tak v těžkém řetězci Muridae nahradit humánními konstantními oblastmi. Takové „chimérické“ murinohumánní protilátky byly úspěšně zkonstruovány z několika murinních protilátek, změřených proti antigenům, které jsou spojeny s humánními nádory (Sun a další (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 214; Whittle a další (1987), Protein Eng., 1, 499; Liu a další (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3439; Gillies a Wesolowski (1990), Hum. Antibod. Hybridomas 1, 47). Při tomto přístupu se úplně zachová místo, vázající antigen murinní protilátky a tedy i afinita pro antigen, a současně se dodají humánní izotypové a efektorové funkce. Při druhém přístupu se pouze roubují oblasti, určující komplementaritu (CDRs), z myších variabilních oblastí spolu s humánními úseky základní struktury (FRs) z variabilních domén z jak lehkého, tak těžkého řetězce (V_L a V_H). Argumentuje se, že při této technice se převede kritická a hlavní část místa, vázajícího antigen, do humánní protilátky (Jones a další (1986), Nature, 321, 14).

Roubování CDR bylo prováděno u několika monoklonálních protilátek, pocházejících z hlodavců (Jones a další (1986) Nature, 321, 14; Reichmann a další (1988), Nature 322, 21; Verhoeven a další (1988), Science 239, 18; Queen a další (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029; Co a další (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2 869; Gorman a další (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4 181; Maeda a další (1991) Hum. Antibod. Hybridomas 2, 124; Tempest a další (1991), Biol. Technology 9, 266). Všechny si zachovaly svou schopnost vázat antigen, přesto že jejich afinita byla obvykle snížena. Ve většině případů bylo zapotřebí vyměnit určité aminokyseliny v humánních úsecích základní struktury (FRs). Při klinickém zkoušení se jak chimérická, tak CDR roubovaná protilátka ukázala být lepší než myší protilátky (Hale a další (1988), Lancet, ii, 1394; LoBuglio a další (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4 220; Mathieson a další (1990) N. Eng. J. Med. 323, 250). V žádném případě však není znám obecný poznatek, které aminokyseliny mají být vyměněny a takovou výměnu nelze ani úplně předvídat.

V EP 088 994 je navržena konstrukce vektorů rekombinantní DNA, které obsahují sekvenci DNA, kódující variabilní doménu lehkého nebo těžkého řetězce imunoglobulinu, specifického pro předem určený ligand. V této citaci se nepředpokládají variace v sekvenci variabilní domény.

V EP 102 634 se popisuje klonování a exprese genů, kódujících celý polypeptid humánního těžkého řetězce IgG nebo jeho část v bakteriálních hostitelských organismech. Ani zde se nepředpokládají variace v sekvenci polypeptidu.

V EP 239 400 se navrhuje, že humanizované protilátky lze získat tím, že se místo, vázající antigen (hypervariabilní oblasti) jakékoliv humánní protilátky, nahradí místem, vázajícím antigen nehumánní, například myší nebo krysí protilátky, prostřednictvím metod genového inženýrství.

Podle této citace je tedy možno vyrábět humánní nebo humanizované protilátky, obsahující specifická místa, vázající antigen, která až dosud nebyla k dispozici v protilátkách, pocházejících z lidí.

Chimérické protilátky je možno získat tak, že se nahradí nejen CDRs, ale celé variabilní oblasti lehkého a těžkého řetězce. Chimérické protilátky mohou však ještě být imunogenní. Chimérické protilátky jsou však velmi užitečné pro diagnostické účely a pro optimalizaci humanizovaných protilátek.

Bylo by možno ukázat, že afinitu míst, vázajících antigen, lze ovlivnit selektivní výměnou některých jednotlivých aminokyselin ve variabilních oblastech, které přímo nejsou součástí CDRs (Reichmann a další (1988), Nature, 322, 21).

- 5 Postupuje-li se podle údajů, uvedených v EP 239 400, může v nejhorším případě dojít k úplné ztrátě vazebné afinity pro antigen. Tuto skutečnost jsou schopni demonstrovat původci tohoto vynálezu, kterým se nepodařilo zkonstruovat odpovídající humanizovanou protilátku, zaměřenou na epitopy receptoru EGF.
- 10 Je proto třeba vzít v úvahu, že úspěšnost takové humanizace závisí na složení a konformaci použitých variabilních oblastí a jejich interakci s odpovídajícím místem, vázajícím antigen. Nelze tedy úplně předvídat, zda nebo které modifikace ve variabilních doménách protilátky je zapotřebí modifikovat, aby se dosáhlo vazby antigenu k protilátce, nebo aby se tato vazba zlepšila.

15

Podstata vynálezu

- 20 Úkolem tohoto vynálezu je tedy vyvinout humanizovanou monoklonální protilátku, která je zaměřena zejména na receptory EGF a která obsahuje místo, vázající antigen nehumánního původu, a úseky základní struktury (FRs) z variabilních oblastí a konstantních oblastí humánního původu, které jsou, v případě potřeby, modifikovány takovým způsobem, aby specifita vazebného místa zůstala zachována, nebo se regenerovala.

- 25 Úkolem tohoto vynálezu je především charakterizovat hypervariabilní oblasti místa, vázajícího antigen protilátky proti receptoru EGF, a zavést tyto CDRs do humanizované monoklonální protilátky, definované výše.

- 30 Tato protilátka a její chimérická varianta může hrát důležitou úlohu jako terapeutické nebo diagnostické činidlo, sloužící k potlačování nádorů, jako jsou melanomy, gliomy nebo karcinomy.

- 35 Zjistilo se, že účinné a specifické humanizované monoklonální protilátky je možno snadno získat za použití konvenční sekvence přinejmenším z variabilních oblastí těžkého řetězce humánních imunoglobulinů. Vhodné jsou zejména všechny takové konvenční sekvence, které vykazují dobrou identitu (alespoň ze 60 až 70 %, zejména ze 65 až 70 %) ve srovnání s variabilními oblastmi původních nehumánních protilátek.

- 40 Dále se zjistilo, že tyto konvenční sekvence musí být modifikovány pouze v malém rozsahu, zatímco za použití variabilních oblastí přírodních humánních protilátek je třeba někdy provádět mnohem více modifikací. Často není nutno provádět žádné modifikace, nebo je nutno provádět jen málo modifikací v sekvenci aminokyselin, aby se podle vynálezu dosáhlo dobré specifické vazby antigenu. Je tedy třeba vyměnit pouze několik aminokyselin pro dosažení perfektní vazby receptoru EGF k přednostní humanizované protilátce podle tohoto vynálezu. Podle poznatků, 45 uvedených v EP 239 400, nelze v tomto případě dosáhnout vazby. Stupeň modifikace, kterého je podle vynálezu zapotřebí, je možno charakterizovat výměnou aminokyselin v rozsahu od 0 do 10 %, přednostně od 1 do 5 %.

- 50 Humanizovaná monoklonální protilátka podle tohoto vynálezu má následující výhody: Konvenční sekvenci, což je sekvence, odpovídající nejčastějšímu výskytu aminokyselin v určité poloze řetězce humánního imunoglobulinu z definované třídy, podtřídy nebo podskupiny, je možno bez problémů syntetizovat jako celek nebo jako část. Není zde závislost na podrobné znalosti nebo dostupnosti určitých individuálních protilátek nebo jejich fragmentů. To znamená, že je možno pokrýt široký rozsah individuálně a přírodně se vyskytujících fragmentů protilátky

prostřednictvím velmi omezeného počtu konvenčních sekvencí, které se klonují do odpovídajících expresních vektorů. Konvenční sekvence může být příznivá, pokud se týče imunogenicity, ve srovnání s individuálními přírodními sekvencemi, o nichž je známo, že se někdy jedná o epitopy pro jiné protilátky (například anti-idiotypické protilátky).

5

Ačkoliv bylo skutečně realizováno jen jedno přednostní provedení, poskytuje tento vynález obecné základní poznatky. Vzhledem k velkému počtu možných sekvencí a kombinací sekvencí ve variabilní a hypervariabilní doméně není pouhou náhodou, že se na základě popsaných poznatků, vztahujících se ke konvenční sekvenci, podařilo zkonstruovat humanizovanou protilátku, zaměřenou na receptory EGF.

10

Dále se zjistilo, že těžké řetězce variabilních domén dodávají větší příspěvek místu, vázajícímu antigen, ve srovnání s odpovídajícími lehkými řetězci. Není proto nutno modifikovat stejným způsobem lehký řetězec humanizované protilátky, obsahující konvenční sekvenci. Tento aspekt je zajímavý, poněvadž je známo, že lehké řetězce hrají u některých známých přírodních protilátek důležitější úlohu než odpovídající těžké řetězce (viz Williams a další (1990) Tibtech. 8, 256).

15

Podle vynálezu je konečně možno poprvé provést pomocí genetického inženýrství charakterizaci, klonování a amplifikaci místa, vázajícího antigen murinní protilátky proti receptoru EGF (Mab 425). Tento aspekt vynálezu je nejdůležitější. Je možno syntetizovat odpovídající oligonukleotidy, kódující toto místo, vázající antigen a celou variabilní doménu humanizované a chimérické monoklonální protilátky. Předmětem vynálezu jsou dále také odpovídajícím způsobem účinné expresní vektory, kterých lze používat pro transformaci vhodných eukaryotických buněk.

25

Předmětem vynálezu je tedy chimérická monoklonální protilátka, obsahující místa, vázající antigen, CDR nehumánního původu, úseky základní struktury FR nehumánního původu a konstantní oblasti humánního imunoglobulinu, která vykazuje tyto znaky:

30

i) váže se k humánním receptorům EGF a inhibuje vazbu EGF k receptoru EGF,

ii) konstantní oblasti jejího těžkého řetězce zahrnují sekvenci aminokyselin humánního řetězce gamma-1 a konstantní oblasti lehkého řetězce zahrnují sekvenci aminokyselin humánního řetězce kappa,

35

iii) její oblasti CDR, reprezentující místa, vázající antigen, zahrnují následující sekvence aminokyselin

40 lehký řetězec

CDR-1 -Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Thr-Tyr-Met-Tyr-

CDR-2 -Asp-Thr-Ser-Asn-Leu-Ala-Ser-

CDR-3 -Gln-Gln-Trp-Ser-Ser-His-Ile-Phe-Thr-

45

těžký řetězec

CDR-1 -Ser-His-Trp-Met-His-

CDR-2 -Glu-Phe-Asn-Pro-Ser-Asn-Gly-Arg-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Ser-

50

CDR-3 -Arg-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Arg-Tyr-Phe-Asp-Tyr-

iv) jejími úseky základní struktury, FR, variabilní oblasti, která nemá vztah k místům vázajícím antigen, zahrnují následující aminokyselinové sekvence

lehký řetězec

- FR-1 -Gln-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ile-Met-Ser-Ala-Ser-Pro-Gly-Glu-Lys-
Val-Thr-Met-Thr-Cys-
- 5 FR-2 -Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Ser-Ser-Pro-Arg-Leu-Leu-Ile-Tyr-
- FR-3 -Gly-Val-Pro-Val-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr-Ser-Leu-Thr-
Ile-Ser-Arg-Met-Glu-Ala-Glu-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-
- FR-4 -Phe-Gly-Ser-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-

10 těžký řetězec

- FR-1 -Gln-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Pro-Gly-Ala-Glu-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-
Val-Lys-Leu-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-
- FR-2 -Trp-Val-Lys-Gln-Arg-Ala-Gly-Gln-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-
- 15 FR-3 -Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr-Met-Gln-Leu-Ser-
Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-Ser-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Ser-
- FR-4 -Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-

20 Předmětem vynálezu je dále expresní vektor, obsahující sekvenci DNA, kódující variabilní a konstantní oblast lehkého řetězce výše uvedené chimérické monoklonální protilátky, který nese označení pCVL425 a je uložen ve sbírce DSM pod přírůstkovým číslem DSM 6338.

25 Předmětem vynálezu je dále expresní vektor, obsahující sekvenci DNA, kódující variabilní a konstantní oblast těžkého řetězce výše uvedené chimérické monoklonální protilátky, který nese označení pCVH425 a je uložen ve sbírce DSM pod přírůstkovým číslem DSM 6337.

Konečně je předmětem vynálezu také farmaceutický prostředek, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje výše uvedenou chimérickou monoklonální protilátku.

30 Všechny citace patentů a publikací, uvedené výše a dále v tomto textu, představují náhradu za přenesení jejich celého obsahu do popisu tohoto vynálezu.

Mikroorganismy a plazmidy, použité při provádění vynálezu

35 a) pRVL425 (= HCMV-RV_L425-k) uložen 1. února 1991 v souladu s Budapešťskou dohodou v Německé sbírce mikroorganismů (DSM) pod přírůstkovým číslem DSM 6340. Expresní vektor obsahuje sekvence hypervariabilních oblastí (CDRs) murinní protilátky 425 a FRs variabilní oblasti a konstantní (kappa) oblasti lehkého řetězce humanizované protilátky. Symbol R znamená „přetvořený“ (reshaped).

40 b) pRVH425 (= HCMV-RV_H425-gamma), uložen 1. února 1991 v souladu s Budapešťskou dohodou v Německé sbírce mikroorganismů (DSM) pod přírůstkovým číslem DSM 6339. Tento expresní vektor obsahuje sekvence hypervariabilních oblastí (CDRs) murinní protilátky 425 a RFs variabilní oblasti a konstantní (gamma-1) oblasti těžkého řetězce humanizované protilátky. Symbol R znamená „přetvořený“ (reshaped).

45

c) pCVL425 (= HCMV-CV_L425-k), uložen 1. února 1991, v souladu s Budapešťskou dohodou, v Německé sbírce mikroorganismů (DSM) pod přírůstkovým číslem DSM 6338. Tento expresní vektor obsahuje sekvence FRs a hypervariabilních oblastí (CDRs) variabilní oblasti lehkého řetězce murinní protilátky 425 a konstantní (kappa) oblasti lehkého řetězce humánního imunoglobulinu. Symbol C znamená „chimérický“.

50

d) pCVH425 (= HCMV-CV_H425-gamma), uložen 1. února 1991 v souladu s Budapešťskou dohodou v Německé sbírce mikroorganismů (DSM) pod přírůstkovým číslem DSM 6337. Tento

expresní vektor obsahuje sekvence FRs a hypervariabilních oblastí (CDRs) variabilní oblasti lehkého řetězce murinní protilátky 425 a konstantní oblasti lehkého řetězce humánního gamma-1 imunoglobulinu. Symbol C znamená „chimérický“.

- 5 e) Hybridoma buněčná linie 425, uložena 26. února 1988 v souladu s Budapešťskou dohodou v americké sbírce American Type Culture Collection (ATCC) pod přírůstkovým číslem HB 9629. Tato buněčná linie produkuje murinní protilátku 425, která je zaměřena na receptor EGF.

10 Jiné biologické materiály:

- jiné mikroorganismy, buněčné linie, plazmidy, promotory, markery rezistence, replikační počátky nebo jiné fragmenty vektorů které jsou uvedeny v tomto popisu, jsou obchodně nebo jinak obecně dostupné. Pokud není v tomto popisu uvedeno jinak, používá se jich pouze jako
15 příkladů a jejich konkrétní volba není při provádění vynálezů důležitá, takže je možno nahradit je jinými vhodnými prostředky a biologickými materiály.

Pro amplifikaci odpovídajících sekvencí DNA se přednostně používá bakteriálních hostitelů. Jako příklad takových hostitelů je možno uvést E. coli nebo Bacillus.

- 20 Při výrobě humanizovaných a chimérických protilátek podle tohoto vynálezu se dává přednost eukaryotickým buňkám, jako je COS (CV1 původ SV 40), nebo buňkám z vaječníků čínského křečka (CHO), nebo kvasinkám. Obzvláštní přednost se dává buňkám COS a CHO.

25 Obecné postupy výroby:

Technologie, které jsou pro provádění tohoto vynálezu podstatné, jsou podrobně uvedeny v tomto popisu.

- 30 Jiné technologie, které nejsou podrobně popsány, odpovídají známým standardním technologiím, které jsou dobře známy odborníkům v tomto oboru, nebo které jsou popsány podrobněji v uvedených literárních odkazech, patentových přihláškách a standardní odborné literatuře.

35 Přehled obrázků na výkrese

- Na obr. 1 jsou schematicky znázorněny vektory, používané pro expresi chimérických a přetvořených humánních protilátek. Restrikční místa, používaná při konstrukci expresních plazmidů, jsou označena. Sekvence, kódující variabilní oblast, jsou znázorněny černými úseky,
40 konstantní oblasti jsou znázorněny bílými úseky, promotor HCMV a zesilovač transkripce (enhancer) šrafovanými úseky a nukleotidový fragment z plazmidu pSVneo je znázorněn tečkovanými úseky. Směry transkripce jsou znázorněny šipkami.

- Na obr. 2 jsou znázorněny sekvence nukleotidů a aminokyselin V_{H425} (A) a V_{L425} (B) cDNA, klonované do pUC18. Aminokyseliny, přispívající k vedoucí sekvenci (leader), jsou podtrženy
45 a CDRs jsou označeny závorkami. Místa sestřihu mezi variabilními oblastmi a konstantními oblastmi jsou také znázorněna. Také jsou zde znázorněny přední a zadní PCR–primary a jejich místa teplotní hybridizace (annealing sites), použitá při konstrukci genů, kódujících chimérické protilátky.

- 50 Na obr. 3 jsou uvedeny sekvence nukleotidů a aminokyselin syntetizovaného genového fragmentu, kódujícího přetvořenou humánní V_{H425} . Vedoucí sekvence je podtržena a rezidua, přispívající k CDRs, jsou v závorkách.

Na obr. 4 je uvedeno srovnání sekvence aminokyselin myši a přetvořené humánní variabilní oblasti 425. Panel A ukazuje sekvenci myši V_L (V_L425) a přetvořené humánní V_LS ($RV_{La}425$ a $RV_{Lb}425$). Panel B ukazuje sekvence myši V_H (V_H425) a přetvořené humánní V_HS ($RV_{Ha}425$, $RV_{Hb}425$, $RV_{Hc}425$, $RV_{Hd}425$, $RV_{He}425$, $RV_{Hf}425$, $RV_{Hg}425$, $RV_{Hh}425$, $RV_{Hi}425$ a jsou označeny FRs a CDRs. Aminokyseliny jsou číslovány podle Kabat a další /1987/ Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices.

Na obr. 5 je znázorněn molekulární model variabilních oblastí myši MAb 425.

Na obr. 6 je znázorněna detekce vazby k EGFR pomocí metody ELISA. Aktivita vazby antigenu se stanovuje ve zředěných supernatantech transfekovaných COS buněk a vynáší se do grafu jako optická hustota při 450 nm proti koncentraci IgG (zjištěná metodou ELISA, viz část popisu „Materiály a metody“). Všechny verze přetvořených humánních V_H oblastí se kontrafektují s $RV_{La}425$ a jsou reprezentovány následujícími grafickými symboly: $RV_{Ha}425$ $\triangle$, $RV_{Hb}425$ $\diamond$, $RV_{Hc}425$ Δ , $RV_{Hd}425$ $\otimes$, $RV_{He}425$ $\square$, $RV_{Hf}425$ $\boxtimes$, $RV_{Hg}425$ $\square$, $RV_{Hh}425$ $\circ$, $RV_{Hi}425$ $\odot$, $RV_{Hb}425$ ko-transfekovaný s $RV_{Lb}425$ je reprezentován symbolem $\blacklozenge$. Produkty kotransfekce chimérického $VL425$ a $VH425$ jsou reprezentovány symbolem $\bullet$.

Na obr. 7 je znázorněna konkurence při vazbě k antigenu. V okénku A je znázorněna konkurence mezi značenou myší protilátkou 425 a (1) neznačenou myší protilátkou 425 (+) a (2) chimérickou protilátkou 425 ($\bullet$), produkovanou buňkami COS po kotransfekci s HCMV- CV_L425 -kappa a HCMV- CV_H425 -gamma-1. V okénku B je znázorněna konkurence mezi značenou myší protilátkou 425 a (1) neznačenou myší protilátkou 425 (+) a (2) přetvořenými humánními protilátkami 425, produkovanými buňkami COS po kotransfekci s HCMV- $RV_{La}425$ -kappa a HCMV- $RV_{Hi}425$ -gamma-1 ($\circ$) a s HCMV- $RV_{La}425$ -kappa a HCMV- $RV_{Hg}425$ -gamma-1 ($\square$). Ve všech případech se na horizontální osu vynáší koncentrace inhibitoru v ng/ml. Na vertikální osu se vynáší procento inhibice vazby.

Na obr. 8 jsou znázorněny účinky různých přetvořených humánních oblastí V_L na vazbu antigenu. V okénku A je ukázána vazba antigenu přetvořenými humánními protilátkami, produkovanými v buňkách COS transfekovaných HCMV- CV_L425 -kappa a HCMV- CV_H425 -gamma-1 ($\bullet$), HCMV- $RV_{La}425$ -kappa a HCMV- $RV_{Hg}425$ -gamma-1 ($\square$), HCMV- $RV_{Lb}425$ -kappa a HCMV- $RV_{Hg}425$ -gamma-1 ($\blacksquare$), HCMV- $RV_{La}425$ -kappa a HCMV- $RV_{Hc}425$ -gamma-1 (Δ) a HCMV- $RV_{Lb}425$ -kappa a HCMV- $RV_{Hc}425$ -gamma-1 ($\circ$). V okénku B je znázorněna konkurence o vazbu k antigenu mezi značenou myší protilátkou 425 a (1) neznačenou myší protilátkou 425 (+) a (2) přetvořenými humánními protilátkami 425, produkovanými v buňkách COS kotransfekovaných HCMV- V_La425 -kappa a HCMV- V_Hg425 -gamma-1 ($\square$) a HCMV- V_Lb425 -kappa a HCMV- V_Hg425 -gamma-1 ($\blacksquare$). V okénku A se na vertikální osu vynáší optická hustota při 450 nm (OD_{450}) a na horizontální osu se vynáší koncentrace IgG v ng/ml. V okénku B se na horizontální osu vynáší koncentrace inhibitoru v ng/ml a na vertikální osu procento inhibice vazby.

Na obr. 9 je v okénku A znázorněna analýza přetvořených (dráhy 1 a 2), chimérické (dráha 3) a murinní (dráha 4) Mabs 425 metodou SDS-PAGE za neredukujících podmínek (a), a za redukujících podmínek (b). Dráhy 7 a 8 odpovídají přetvořeným, dráha 9 chimérické a dráha 10 murinní protilátce. Dráhy 5, 6, 11 a 12 představují markery molekulové hmotnosti. V okénku B je znázorněna purifikace přetvořené MAb 425 gelovou filtrací na Superose 12. Pík 2 odpovídá IgG.

Na obr. 10 je znázorněna konkurence mezi murinní, chimerickou a přetvořenými Mabs 425 o receptor EGF (EGFR). Na vertikální osu se vynáší poměr mezi vázanou (MAb) a celkovou

(MAb) v procentech (% vázaná/celkem). Na horizontální osu se vynáší koncentrace protilátky (mol/l /log/). Používá se následujících symbolů:

- 5 ▽ znamená MAb 425 murinní,
- o znamená MAb 425 chimérickou,
- , ♦ znamená MAb 425 přetvořené.

Na obr. 11 je znázorněna konkurence mezi EGF a protilátkami o receptory EGF. Na vertikální osu se vynáší % vázaná/celkem (MAb). Na horizontální osu se vynáší koncentrace protilátky /mol/l /log/). Symbol o znamená MAb 425 murinní a symboly Δ, ▽, □, znamenají MAb 425 přetvořené.

Následuje podrobný popis vynálezu.

15 Klonování a sekvenování genů variabilní oblasti MAb 425

Ze syntézy cDNA a klonování za použití primeru s kappa řetězcem se pro skríníng přednostně vezme 300 až 400 kolonií. Ze syntézy cDNA a klonování za použití primeru gamma-2a se přednostně pro skríníng vezme 200 až 300 kolonií. Po skríníngu hybridizací za použití dvou odpovídajících klonovacích primerů poskytuje 20 až 30 kolonií s lehkým řetězcem a 10 až 20 kolonií s těžkým řetězcem silné signály. Z těchto kolonií se izoluje plazmidová DNA a analyzuje obvyklým způsobem štěpení obchodně dostupnými restrikčními enzymy, aby se stanovila velikost inzertů cDNA. Jako kandidáti pro sekvenování se zvolí klony zřejmě obsahující inzert 400 až 500 bp v případě V_L klonování, a 500 až 600 bp v případě V_H klonování. Tři V_L klony a tři V_H klony se sekvenují na obou vláknech za použití univerzálních a reverzních sekvenačních primerů M13. Ze tří možných V_L klonů, které byly sekvenovány, jeden kóduje úplnou variabilní oblast a ostatní kódují peptidy, které k ní nemají vztah. Dva z V_H klonů kódují identické V_H oblasti, zatímco ostatní kódují V_H oblast s intronem mezi vedoucí sekvencí a ještě přítomným FR-1. Vedle intronu třetí V_H klon obsahuje kódující sekvenci, která je identická se sekvencemi prvních dvou klonů. Pro ověření sekvence V_L oblasti se sekvenují tři další cDNA klony, které obsahují inzerty vhodné velikosti. Dva z nich poskytují sekvence, které jsou v souhlasu s prvním V_L klonem. Třetí představuje napodobenou DNA sekvenci. V sekvenovaných klonech nejsou přítomny všechny původní sekvence primeru. Rozsah delecí se mění od klonu ke klonu. Tyto delece, k nimž pravděpodobně dochází v průběhu syntézy cDNA a klonování, mohou snížit účinnost skríníngu kolonie.

Geny V_L a V_H MAb 425 jsou znázorněny na obr. 2. Sekvence aminokyselin V_L a V_H oblasti 425 se porovnává s jinými myšími variabilními oblastmi v Kabatově databázi (Kabat a další, (1987) Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices). Oblast V_L je možno zařadit do podskupiny IV nebo VI myších variabilních oblastí s řetězcem kappa. V úsecích základní struktury (FRs) vykazuje oblast 425 V_L přibližně 86% identitu s konvenční sekvencí myší kappa podskupiny IV a přibližně 89% identitu s podskupinou VI. Zdá se, že oblast 425 V_L používá segmentu JK4. Při zkoumání V_H oblasti se zjistí přibližně 98% identita s FRs konvenční sekvence myšího těžkého řetězce z podskupiny II (B).

Správná volba vhodné třídy nebo podskupiny humánního imunoglobulinu je závislá na stupni identity s řetězcem, který je v nehumánní protilátce původně přítomen. Identita dedukované konvenční sekvence podle tohoto vynálezu by měla být vyšší než 65 až 70 %, při srovnávání se sekvencí původního nehumánního řetězce.

Dává se přednost konvenčním sekvencím těžkých řetězců, zejména však konvenční sekvenci humánního těžkého řetězce z podskupiny I. Pro jiné protilátky jsou však vhodné konvenční

sekvence jiných humánních těžkých řetězců. Přednostní konveční sekvence jsou modifikované. Možná výměna aminokyselin činí podle vynálezu 0 až 10 %, přednostně 5 až 10 %.

Konstrukce a exprese chimérické protilátky 425

5

Dříve než je možno použít při konstrukci chimérické protilátky 425 cDNA pro kódování V_L a V_H oblastí, je zapotřebí zavést několik modifikací do 5'– a 3'– konce. Tyto modifikace zahrnují zvedení vhodných míst pro restrikční enzymy tak, aby bylo možno sekvence, kódující variabilní oblast, snadno subklonovat do expresních vektorů HCMV. Je nutno znovu vytvořit donorní sestřižená místa v 3'– lemujících oblastech pro správný a účinný sestřih variabilních oblastí ke konstantním oblastem.

10

Také 5'– lemující oblasti se modifikují, aby obsahovaly sekvenci, která by vytvořila účinná iniciační místa pro translaci eukaryotickými ribosomy (Kozak a další (1987), J. Mol. Bio., 196, 947). Tyto modifikace se zavádějí za použití PCR primerů. Použité primery jsou uvedeny v tabulce I.

15

Tabulka I

20

Oligonukleotidy, použité pro klonování cDNA, konstrukci chimérik a mutagenezi. Podtržené úseky označují báze, které se tepelně hybridizují k humánní struktuře.

číslo	sekvence	popis
25	1. 5'–GTAGGATCCTGGATGGTGGGAAGATG–3'	primer lehkého řetězce pro syntézu cDNA
	2. 5'–GTAGGATCCAGTGGATAGACCGATG–3'	primer těžkého řetězce pro syntézu cDNA
30	3. 5'–CTCCAGCTTGACCTCACCATGG–3'	přední primer chimérické oblasti V_H
	4. 5'–TTGGATCCACTCACCTGAGGAGACTGTGA–3'	zadní primer chimérické oblasti V_H
	5. 5'–AGAAAGCTTCCACCATGGATTTTCAAGTG–3'	přední primer chimérické oblasti V_L
35	6. 5'–GTAGATCTACTCACGTTTTATTCCAAC–3'	zadní primer chimérické oblasti V_L
	7. 5'– <u>ACCATCACCTGT</u> AGTGCAGCTCAAGTG TAACTTACATGTATTGGTACCAGCAG–3'	CDR–1 primer přetvořené oblasti V_L
40	8. 5'– <u>CTGCTGATCTACGACACATCCAACCTGGC</u> <u>TTCTGGTGTGCCAAGC</u> –3'	CDR–2 primer přetvořené oblasti V_L
	9. 5'– <u>ACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTCA</u> – <u>CATATTCACGTTGCGCCAA</u> –3'	CDR–3 primer přetvořené oblasti V_L
	*	
45	10. 5'–AGCGGTACCGACTACACCTTCACCATC–3'	primer pro zavádění F71Y do RV_L
	* *	
	11. 5'–ATACCTTCACATCCCACTG–3'	primer pro zavádění S30T do RV_H
	* *	
50	12. 5'–CGAGTGGATTGGCGAGT–3'	primer pro zavádění V48I do RV_H

Tabulka I (pokračování)

číslo	sekvence	popis
5	13. 5'-TTTAAGAGCAAGGCTACCATGACCGTGGA- CACCTCT-3'	primer pro zavádění R66K, V67A a L71V do RV _H
10	14. 5'-CATGACCGTGGACACCTCT-3'	primer pro zavádění L71V do RV _H
15	Pro každou variabilní oblast cDNA se přednostně vytvoří dva primery. V předních primerech se použije 15 bází na 3'-konci primeru pro hybridizaci primeru k templátové DNA, zatímco 5'-konec primeru obsahuje místo HindIII a „Kozakovu sekvenci“. Zadní primery mají podobné složení. Posledních 15 bází u 3'- konce se použije pro hybridizaci primeru k templátové DNA a 5'-konec primeru obsahuje místo BamHI donorní místo pro sestřih. V případě zadního primeru lehkého řetězce se používá místo BglII místo místa BamHI, poněvadž cDNA, kódující V_L, obsahuje interní místo BamHI (viz obr. 2). Reakce PCR se přednostně provádí způsobem, popsaným v příkladech.	
20	DNA V_L oblasti modifikovaná PCR se klonuje do míst HindIII a BamHI expresního vektoru lehkého řetězce HCMV, jakožto HindIII-BglII fragment. Tento vektor již obsahuje humánní genomovou konstantní oblast kappa s potřebným akceptorovým místem pro sestřih a místy poly(A⁺). Celý PCR-modifikovaný V_L fragment se sekvenuje za použití dvou primerů, které se	
25	tepelně hybridizují k místům, lemujícím klonovací místo expresního vektoru. Sekvenování potvrzuje, že v průběhu stupně PCR nebyly uvedeny žádné chyby. PCR-modifikovaná V_H DNA se klonuje do expresního vektoru těžkého řetězce HCMV jako HindIII-BamHI fragment a také se sekvenuje, aby se potvrdilo, že během PCR nebyly zavedeny žádné chyby. Fragment BamHI, obsahující humánní genomovou konstantní oblast gamma-1, se vloží do vektoru HCMV-CV_H na	
30	3'-straně oblasti V_H. Tento fragment obsahuje potřebné akceptorové místo pro sestřih V-C, který má proběhnout in vivo a přírodní místo poly(A⁺).	
35	Expresní vektory, obsahující chimérické oblasti 425 V_L a V_H, se kotransfektují do vhodných eukaryotických buněk, přednostně buněk COS. Po přibližně 72 hodinách přechodné exprese se médium buněčné kultury zkouší metodou ELISA na přítomnost produkovaného humánního IgG a na vazbu k EGFR proteinu.	
40	Množství humánního IgG, detekovaného v médiu, kolísá v rozmezí od 100 do 400 ng/ml. Vyrobená chimérická protilátka se dobře váže k proteinu EGFR při standardní zkoušce vazby antigenu ELISA, čímž se potvrdí, že byly klonovány a sekvenovány správné myší variabilní oblasti.	
45	Počáteční návržení, konstrukce a exprese přetvořených humánních lehkých a těžkých řetězců 425	
50	Při návrhu přetvořené humánní protilátky 425 se největší důraz klade na oblast V_H, poněvadž tato doména je často při vazbě antigenu nejdůležitější (Amit a další (1986), Science 233, 747; Verhoeyen a další (1988) Science 239, 18). Při volbě humánních FRs, na nichž se mají roubovat myší CDRs, se FRs myší V_H oblasti MAb 425 porovnávají s FRs konvenčních sekvencí ze všech podskupin humánních oblastí V_H (Kabat a další, (1987) viz shora uvedená citace). Toto porovnání ukazuje, že FRs oblastí V_H myší protilátky MAb 425 jsou nejpodobnější FRs humánních oblastí V_H podskupiny I. Je zde 73% identita mezi FRs a přibližně 65% identita mezi celými oblastmi V_H.	

Provede se další srovnávání myší oblasti V_H 425 s jinými myšími oblastmi V_H ze stejných Kabatových podskupin, aby se identifikovaly všechny zbytky FR, které jsou charakteristické pro MAb 425 a mohly by se tedy podílet na vazbě antigenu. Zbytek v poloze 94 myší oblasti V_H MAb 425 je serin, zatímco v jiných oblastech V_H myší podskupiny II (B) a také humánní podskupiny I je zbytkem 94 arginin (Kabat a další, (1987), viz shora uvedená citace). Tato substituce aminokyseliny je neobvyklá a poněvadž poloha 94 přiléhá k CDR-3, jedná se o překvapivě důležitou polohu. Z těchto důvodů se přetvořená oblast V_H humánní 425 přednostně navrhuje tak, že je založena na CDRs myší protilátky MAb 425 a FRs, odvozených z konvenční sekvence humánních FRs z podskupiny I (podle definice Kabata a dalších (1987), viz shora uvedená citace). Polohy 94 ve FR-3 se obsadí serinem, jako je tomu u myší protilátky MAb 425. V polohách konvenční sekvence FRs z humánní podskupiny I, kde nejsou uvedeny jednotlivé aminokyseliny, se zvolí aminokyselina, která se nejčastěji vyskytuje v této poloze. Jestliže se v určité poloze humánní konvenční sekvence nevyskytuje žádná aminokyselina přednostně, volí se jako aminokyselina ta aminokyselina, která se v této poloze sekvence nalézá v oblasti V_H myší MAb 425. Výsledná aminokyselinová sekvence obsahuje první verzi (verzi „a“) přetvořené humánní oblasti V_H 425 (viz obr. 3). Všechny následující verze přetvořené oblasti V_H humánní 425 jsou modifikacemi této první verze.

Navrhne se a syntetizuje (viz příklady a obr. 3) 454bp fragment DNA, který kóduje přetvořenou V_H oblast humánní 425, jak je to popsáno výše. Kromě sekvencí DNA, kódujících aminokyseliny přetvořené V_H oblasti humánní 425, obsahuje tento fragment vedoucí sekvence může být vzata například z protilátky HG3 CL (Rechavi a další, (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 855), což je člen humánní oblasti V_H z podskupiny I (Kabat a další (1987), viz shora uvedená citace). Fragment syntetické DNA také obsahuje eukaryotické translační signály na 5'-konci (Kozak (1987), J. Mol. Bio. 196, 1947), donorní místo pro sestřih na 3'-konci (Breathnach a další (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4853), a místo HindIII na 5'-konci a místo BamHI na 3'-konci, pro subklonování do expresního vektoru HCMV.

Podobného postupu se také použije pro sestrojení přetvořené oblasti V_L humánní 425. Úseky FRs myší V_L oblasti protilátky MAb 425 se porovnají s konvenčními sekvencemi všech podskupin humánních oblastí V_L (Kabat a další (1987), viz shora uvedená citace). U FRs se zjistí přibližně 71% totožnost mezi oblastí V_L myší 425 a humánní oblastí V_L kappa z podskupiny III, a přibližně 70% identita s humánní oblastí V_L kappa z podskupiny I. DNA, kódující humánní FRs humánní oblasti V_L kappa z podskupiny I, je již dostupná z přetvořené humánní oblasti V_L D1.3 (EP 239 400, Winter) a přetvořené humánní Campath-1 (Reichmann a další (1988), Nature 322, 21). Návrh přetvořených humánních oblastí V_L v těchto dvou humánních protilátkách je založen na strukturně vyřešeném humánním imunoglobulinovém proteinu REI (Epp a další (1975), Biochemistry 14, 4943). Z těchto důvodů se také používá humánních FRs z oblasti V_L z přetvořené humánní protilátky D1.3 a CAMPATH-1H v přetvořené humánní oblasti V_L 425. Srovnání FRs myší oblasti V_L 425 s FRs jiných myších protilátek z podobných podskupin neukazuje žádné podstatné rozdíly ve zbytcích aminokyselin ve funkčně důležitých polohách. Z těchto důvodů nejsou zapotřebí žádné změny v humánních FRs. Sekvence aminokyseliny přetvořené humánní oblasti V_L 425 verze „a“ je ukázána na obr. 4.

Pro konstrukci přetvořené humánní V_L oblasti 425 se sestrojí tři oligonukleotidy, obsahující interní sekvence DN, kódující tři CDRs myší V_L oblasti 425, a 12 bází na 5'- a 3'- koncích, které jsou určeny pro hybridizaci se sekvencemi DNA, které kódují humánní FRs v přetvořené humánní V_L oblasti protilátky D1.3 (viz oligonukleotidy 7 až 9 v tabulce I). Roubování CDR se provádí způsobem popsaným v příkladech. Po sekvenování DNA pravděpodobných pozitivních klonů ze skrínungu je celkový výtěžek trojnásobného mutantu 5 až 15 %, přednostně 9 až 10 %. Přetvořená V_L oblast humánní 425, která neobsahuje žádné PCR omyly, se klonuje jako fragment HindIII – BamHI do expresního vektoru lehkého řetězce za vzniku plazmidu HCMV-RV_La425-kappa (viz obr. 1).

Dva expresní vektory, nesoucí přetvořené oblasti V_L 425 a V_H 425, se nyní kotransfektují do vhodných buněk (viz výše), za účelem hledání přechodné exprese funkční přetvořené humánní protilátky 425. Přibližně po 72 hodinách se buněčné supernatanty sklídí a metodou ELISA se v nich stanovuje humánní IgG. Humánní IgG může být stanoven na úrovni v rozmezí od 100 do 500 ng/ml, avšak při zkoušce ELISA, zaměřené na stanovení vazby antigenu, není vazba k EGFR s překvapením detekovatelná. Jestliže se buňky kotransfektují HCMV-RV_L425-kappa/HCMV-CV_H425-gamma-1, vyrobí se humánní IgG, který se váže k EGFR. Jestliže se však buňky kotransfektují HCMV-CV_L425kappa/HCMV-RV_H425-gamma-1, vyrobí se humánní IgG, který se však na detekovatelné úrovni neváže k EGFR. Z těchto neočekávatelných výsledků je zřejmé, že je zapotřebí dalších modifikací s charakterem vynálezu ve FRs přetvořené humánní oblasti V_H 425, aby se získalo funkční místo, vázající antigen.

Modifikace FRs přetvořené oblasti V_H humánní 425

Na základě molekulárního modelu domén myších variabilních oblastí 425 se provedou další změny ve FRs přetvořené humánní V_H oblasti 425. Prozkoumají se smyčky CDR přetvořené humánní oblasti V_H , aby se zjistilo, jak se shodují s kanonickými strukturami, které popsali Chothia a další (1989), nature 342, 877. Na základě této analýzy se provedou ve FRs určité změny. Provedou se také jiné změny FRs, které jsou založeny na funkční přetvořené humánní protilátce anti-Tec, která byla rovněž sestrojena na základě humánních FRs z podskupiny I (Queen a další (1989), Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 10 029). S překvapením bylo zjištěno, že oblast V_H myší protilátky anti-Tec je přibližně ze 79 % identická s V_H oblastí myší protilátky 425. Nyní se podle vynálezu vytvoří molekulární model variabilních oblastí myší protilátky 425 (obr. 5). Model je založen na struktuře HYHEL-5, což je protilátka s vyjasněnou strukturou, jejíž variabilní oblasti vykazují vysoký stupeň homologie s oblastmi myší protilátky 425. Na základě této analýzy se zbytky aminokyselin v polohách 30, 48, 67, 68 a 71 v přetvořené humánní oblasti V_H protilátky 425 změní tak, aby byly identické se zbytky aminokyselin, které se vyskytují v těchto polohách v myší oblasti V_H protilátky 425. Pro ozřejnění individuálních účinků těchto změn se prováděné změny při konstrukci podle vynálezu různě kombinují a potom zkoušejí.

Celkem se zkonstruuje 8 nových verzí přetvořené oblasti V_H humánní protilátky 425 (viz obr. 4). Z verzí, které se vytvoří způsoby, podrobně popsány v příkladech, se další verze vyrobí rekombinací malých fragmentů DNA z dřívějších verzí. Když jsou již všechny požadované verze sestaveny, přednostně v pUC18, přenesou se přetvořené V_H oblasti humánní protilátky 425 ve formě fragmentů HindIII-BamHI do expresního vektoru HCMV- V_H za vzniku verzí „b“ až „i“ plazmidu HCMV-RV_H425-gamma-1 (obr. 4).

Modifikace ve FRs přetvořené oblasti V_L humánní protilátky 425

Ačkoliv odpovídající buňky, kotransfektované vektory, exprimujícími přetvořený lehký řetězec humánní protilátky 425, verzí „a“ a chimérickým těžkým řetězcem protilátky 425, skutečně produkují protilátku, která se váže k EGFR, protilátka s přetvořeným lehkým řetězcem humánní protilátky 425 se neváže tak dobře, jako chimérická protilátka 425. Prozkoumáním oblastí V_L myší protilátky 425 a přetvořené humánní verze „a“ protilátky 425 ukazuje, že zbytek 71, který je součástí kanonické struktury CDR-1 (L1), není zachován ve verzi „a“ (Chothia a další (1989), Nature 342, 877). Pro zavedení změny Phe na Tyr v této poloze se přednostně použije PCR-mutagenese (Kamman a další (1989), Nucleic Acids Res. 17, 5404). Fragment HindIII-BamHI, vzniklý touto mutagenézou, se zavede do expresního vektoru HCMV- V_L pro vytvoření HCMV-RV_Lb425-kappa (viz obr. 4).

Analýza nových verzí přetvořené oblasti V_H humánní protilátky 425

Expresní vektory, obsahující přetvořené humánní verze V_H „a“ až „i“, se kotransfektují do shora uvedených buněk s expresním vektorem, obsahujícím přetvořenou humánní V_L oblast verze „a“.

Po asi 3 dnech se buněčné supernatanty analyzují metodou ELISA na produkci humánního IgG. Úroveň produkce kolísá v rozmezí od 50 do 400 ng/ml. Potom se vzorky analyzují metodou ELISA na humánní IgG, který je schopen se vázat k EGFR. Různé verze přetvořených humánních oblastí V_H mají za následek mnoho různých úrovní vazby antigenu (viz obr. 6). Při tomto testu ELISA na vazbu antigenu se mohou různé přetvořené humánní protilátky 425 přímo porovnávat s chimérickou protilátkou 425, ale nikoliv s myší protilátkou 425. Je tomu tak proto, že protilátkou, použitou pro detekci vazby k antigenu, je antihumánní protilátka IgG. Devět verzí přetvořené humánní oblasti V_H je možno rozdělit do skupin podle jejich schopnosti vazby k EGFR. Verze „g“ a „i“ přetvořené humánní oblasti V_H poskytují nejvyšší úroveň vazby, potom následující verze „c“, „f“ a „h“, načež následuje verze „b“. Při některých pokusech poskytuje verze „e“ nízkou, ale detekovatelnou úroveň vazby. Verze „a“ a „d“ nikdy neposkytují detekovatelnou úroveň vazby.

Pro přímé porovnání přetvořených humánních protilátek 425, obsahujících verze „g“ a „i“ V_H , a chimérické protilátky 425 s myší protilátkou 425 se použije konkurenčního vazebného testu (viz obr. 7). Jelikož protilátky v buněčných supernatantech nejsou purifikovány a proto jsou kvantifikovány metodou ELISA, je třeba považovat výsledky konkurenčního vazebného testu za hodnoty relativní úrovně vazby, spíše než za přesnou kvantifikaci afinity. Konkurenční vazebné testy se vzorky ze 4 pokusů, například v buňkách COS, poskytují konzistentní výsledky, pokud se týče relativní úrovně vazby k antigenu. Chimérická protilátka 425 dobře soutěží se značenou myší protilátkou 425 a poskytuje procentuální inhibici vazby, která je právě o něco nižší, než je inhibice při konkurenčním testu za použití neznačené myší protilátky 425, která soutěží se značenou myší protilátkou 425 (viz obr. 7, okénko A). Přetvořená humánní protilátka s oblastí V_{La} a V_{Hi} (viz obr. 7, okénko B). Porovnání bodů, které odpovídají „plató“ na křivkách vazby, ukazuje, že přetvořená humánní protilátka s oblastí V_{Hg} soutěží se značenou myší protilátkou 425 ze 60 až 80 % tak dobře, jako to činí neznačená myší protilátka 425 při stejném testu. Když se zprůměrují výsledky za použití vzorků ze 4 nezávislých pokusů, například za použití buněk COS nebo CHO, dospěje se ke zjištění, že přetvořená humánní protilátka, obsahující oblast V_{La} a V_{Hg} , poskytuje vazbu, která odpovídá 60 až 80 % vazby myší protilátky 425.

Na základě těchto výsledků je možno komentovat relativní příspěvky jednotlivých zbytků ve FRs struktuře k vazbě antigenu. Nejsignifikantnější jednotlivá změna v této studii je změna L71V. Bez této změny s překvapením nelze detekovat žádnou vazbu k antigenu (srovnej verze „a“ a „b“ V_H). Pro vazbu jsou s překvapením důležité také změny R67K a V68A (srovnej verze „b“ a „c“ a verze „i“ a „h“ V_H). Zatímco zavedení samotné změny V48KI a změn V48I a S30T společně nemá za následek signifikantní vazbu antigenu, změny v těchto polohách skutečně zvyšují vazbu antigenu. Změna S30T má s překvapením vyšší účinek než změna V48I (srovnej verze „g“ a „i“ a verze „f“ a „i“ V_H).

Analýza nové verze přetvořené oblasti V_L humánní protilátky 425

Expresní vektor, obsahující RV_{Lb425} , se kotransfektuje do vhodných, přednostně eukaryotických buněk s expresním vektorem, obsahujícím verze „b“, „c“ nebo „g“ přetvořené humánní oblasti V_H . Sklidí se buněčné supernatanty a zkouší na produkci humánního IgG a potom na humánní IgG, který je schopen vazby k EGFR (viz obr. 8, okénko A). Tyto výsledky ukazují, že verze „b“ V_L oblasti přetvořené humánní protilátky 425 zvyšují vazbu k antigenu. Potom se provede konkurenční vazebný test za účelem porovnání přetvořených humánních protilátek 425 s oblastí V_{La} plus V_{Hg} a V_{Lb} plus V_{Hg} s myší protilátkou 425. Přetvořená humánní protilátka MAb 425s verzí „b“ oblasti V_L má vyšší afinitu pro antigen. Změna F71Y v oblasti V_L tedy

zvyšuje vazbu antigenu. Přetvořená humánní protilátka MAb 425 s oblastí V_L b a V_H g vykazuje afinitu pro antigen, která činí 60 až 80 % afinity murinní protilátky MAb 425.

5 Z jiných experimentů za použití přetvořené humánní protilátky, obsahující kombinaci V_L b plus V_H g (viz příklady 10 a 11), je zřejmé, že vazebná potence k EGFR je podobná pro chimérickou, přetvořenou a murinní protilátku.

Z vynálezu je zřejmé, že poměrně konzervativní změny ve FR zbytcích mohou silně ovlivnit vazbu antigenu.

10 Molekulární model variabilních oblastí myší protilátky 425 jasně ukazuje, že tento zbytek v poloze 30 V_H je na povrchu této molekuly v sousedství CDR-1. Ve skutečnosti H1 podle definice, kterou provedli Chothia a Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196, 901, zasahuje od zbytku 26 do zbytku 32, takže zahrnuje zbytek v poloze 30. Když se zbytek v poloze 30 v protilátce
15 CAMPATH-1H změní ze Ser na Thr, nemá to žádný vliv na vazbu antigenu. Když se poloha 30 změní ze Ser na Thr v přetvořené humánní oblasti V_H 425, zlepší se vazba k antigenu. Ukazuje se, že aminokyselina v poloze 30 skutečně hraje určitou úlohu při vazbě antigenu při této konkrétní interakci protilátky s antigenem. Jelikož změna S30T zlepšuje vazbu antigenu pouze nepatrně a jelikož tato změna není pro vazbu antigenu podstatná, vykazuje Thr v poloze 30 pouze slabou
20 interakci s antigenem.

Změna zbytku v poloze 71 ve V_H silně ovlivňuje vazbu antigenu. Tato skutečnost je překvapující, poněvadž dva zbytky, které byly zkoušeny v této poloze, tj. Val a Leu, se liší pouze jednou
25 methylskupinou. H2 myší protilátky 425 je členem H2 skupiny 2 kanonických struktur, definovaných Chothiou a dalšími (1989), Nature 342, 877. HyHEL-5 má H2 se sekvencí aminokyselin podobnou té, kterou má H2 myší protilátky 425. V HyHEL-5 Pro v poloze 52A v CDR-2 se sbalí do dutiny, vytvořené malou aminokyselinou (Ala) v poloze 71 FRs. V modelu variabilních oblastí myší protilátky 425 existuje podobná interakce mezi Pro-52A a Val-71. Ve
30 V_H myší protilátky 425 je sice Pro v poloze 52A schopen sbalit se do dutiny, vytvořené Val v poloze 71, nahrazení Val-71 Leu však způsobuje molekulární kolizi, která může změnit konformaci smyčky CDR2. Z tohoto důvodu změna V71L v přetvořené V_H oblasti humánní protilátky 425 znovu vytváří interakci CDR-2-FR, k jaké dochází v oblasti V_H myší protilátky 425. To s překvapením velmi zlepšuje vazebné vlastnosti pro antigen přetvořených humánních protilátek 425 (srovnej přetvořené humánní protilátky s verzemi „a“ a „b“ V_H na obr. 6).

35 Změna v poloze 71 V_L pravděpodobně ovlivňuje konformaci CDR, poněvadž zbytek 71 je členem navrhované kanonické struktury pro L1 (CDR-1) (Chothia a další (1989), viz shora uvedená citace). Zbytek 29 v CDR-1 je „pohřbený zbytek“ (buried residue) a má styk se zbytkem 71 ve FRs. V myší protilátce 425 je zbytkem 71 ve V_L Tyr. V humánních FRs, používaných pro konstrukci přetvořených humánních oblastí V_L , je zbytkem 71 Phe. Ukazuje se,
40 že hydroxyskupina, která je přítomna v Tyr, ale nikoliv ve Phe, má úlohu při udržování správné konformace CDR-1.

45 Z molekulárního modelu variabilních oblastí myší protilátky 425 je zřejmé, že Lys-66 vytváří solný můstek s Asp-86. Zavedení většího zbytku Arg do polohy 66 by tuto strukturu rozbilo. Ala-67 může interagovat s CDR-2 a současná výměna zbytků 66 a 67 na Arg a Val, jako ve V_H 425, by mohla mít nepříznivý sterický účinek na CDR-2. Zbytek v poloze 48 je, jak známo, zbytek „pohřbený“ (Chothia a Lesk (1987), viz shora uvedená citace) a model tuto skutečnost potvrzuje. Změna zbytku 48 z Ile, který se nalézá v myší protilátce 425, na Val, který se nalézá
50 v humánních oblastech V_H podskupiny I, by mohl ovlivnit vazbu antigenu obecně tím, že by došlo k rozbití této struktury. Také aminokyselina v poloze 48 je blízko CDR-2 a může mít malý sterický účinek na smyčku CDR-2.

Ze studií konkurenční vazby je zřejmé, že nejlepšími přetvořenými humánními oblastmi V_L a V_H jsou oblasti V_{Lb} a V_{Hg} . V_{Hg} obsahuje všech pět změn FR, diskutovaných výše, a zároveň změnu v poloze 94, která je zahrnuta v první verzi v oblasti V_H přetvořené humánní protilátky 425. FRS ve verzi „b“ oblasti V_L přetvořené humánní protilátky 425 jsou ze 70 % identické s FRS v oblasti V_L myši protilátky 425. FRS ve verzi „g“ oblasti V_H přetvořené humánní protilátky 425 jsou z 80 % identické s příslušnými oblastmi myši protilátky.

Terapeutické a diagnostické použití protilátek podle vynálezu

Protilátky podle vynálezu je možno podávat humánním pacientům z terapeutických nebo diagnostických důvodů v souladu s postupy, známými z dosavadního stavu techniky. Obvykle se protilátka nebo její fragmenty podávají ve formě parenterálních injekcí, přednostně intraperitoneálně. Monoklonální protilátky podle tohoto vynálezu se však také mohou podávat intravenózně.

Stanovení vhodných titrů protilátky pro podávání je v rozsahu zkušeností odborníků v tomto oboru. Obvykle se při podávání monoklonálních protilátek podle vynálezu používá tak velkého rozmezí dávkování, aby se jím dosáhlo požadovaného účinku při potlačování nádorů. Dávkování by nemělo být tak vysoké, aby způsobovalo nepříznivé vedlejší účinky, jako jsou nežádoucí křížové reakce, anafylaktické reakce apod. Dávkování se bude obvykle lišit v závislosti na stáří, zdravotním stavu, pohlaví a rozvoji choroby u pacienta a je v rozsahu zkušeností odborníků v tomto oboru. Ošetřující lékař může dávkování upravit v případě jakýchkoliv kontraindikací, imunologické tolerance nebo podobných stavů. Dávkování může kolísat v rozmezí od 0,1 do 70 mg/kg, přednostně od 0,1 do 50 mg/kg, přičemž tato dávka se může podávat jednou nebo několikrát denně po dobu jednoho nebo více dnů.

Přípravky pro parenterální podávání zahrnují sterilní vodné nebo nevodné roztoky, suspenze a emulze. Jako příklady nevodných rozpouštědel je možno uvést propylenglykol, polyethylen-glykol, rostlinné oleje, jako olivový olej, a organické estery, které je možno podávat injekčním způsobem, jako je ethyleleát. Vodné nosiče zahrnují vodu, vodně-alkoholické roztoky, emulze nebo suspenze, včetně fyziologického roztoku a tlumených médií. Parenterální vehikula zahrnují roztok chloridu sodného, Ringerovu dextrózu, dextrózu a chlorid sodný, laktátované Ringerovy přípravky nebo stabilní oleje. Intravenózní vehikula zahrnují přípravky doplňující kapalinu a živiny, nebo elektrolyt, jako jsou přípravky na bázi Ringerovy dextrózy apod. Také mohou být přítomny konzervační látky a jiné přísady, jako například antimikrobiální látky, antioxidanty, chelatační činidla, inertní plyny apod.

Protilátky mohou být konjugovány k toxinu, jako je ricinová podjednotka A, toxin diphteria, nebo k toxickému enzymu. Alternativně mohou být označeny radioaktivním izotopem v souladu se známými metodami tohoto oboru. Protilátka podle tohoto vynálezu však vykazuje vynikající cytotoxicitu za nepřítomnosti toxinu a za přítomnosti efektorových buněk, jako jsou humánní monocyt.

Tuhé nádory, které je možno detekovat a léčit za použití způsobů podle tohoto vynálezu, zahrnují melanomy, gliomy a karcinomy. Rakovinné buňky, které neexprimují receptory EGFR ve velkém rozsahu, je možno indukovat, aby tak činily, za použití lymfokinových přípravků. Lymfokinové přípravky mohou také způsobovat homogennější expresi receptorů EGF v buňkách nádoru, což vede k účinnější léčbě.

Lymfokinové přípravky, které se hodí v této souvislosti pro podávání, zahrnují interferon-gamma, faktor nekrózy nádorů a jejich kombinace. Lze je podávat intravenózně. Vhodná dávka lymfokinů činí 10 000 až 1 000 000 jednotek na pacienta.

Pro diagnostické účely je možno protilátku konjugovat k radio-opaknému barvivu, nebo je možno ji značit radioizotopem. Přednostní metodou značení je Jodogenová metoda (Fraker a další (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849). Pro diagnostické účely se protilátka přednostně podává ve formě fragmentů $F(ab')_2$. To zajišťuje dosažení vynikajících výsledků, takže není nutno odečítat pozadí. Fragmenty je možno připravovat známými postupy (viz například Herlyn a další (1983), Cancer Res. 43, 2731). Obvykle se provádí štěpení pepsinem při kyselém pH a fragmenty se oddělují od nerozštěpeného IgG a fragmentů těžkého řetězce chromatografií na Protein A–Sephrose^(R).

Přetvořené humánní protilátky 425 podle tohoto vynálezu způsobují u lidí imunologickou odpověď s nižší pravděpodobností, než myši nebo chimérické protilátky 425. Afinita nejlepší verze přetvořené humánní protilátky 425, která tvoří nejlepší provedení tohoto vynálezu, je stejná, jako afinita myši nebo chimérické protilátky 425. Vazebné studie ukazují, že schopnost soutěžit s EGF o vazbu k EGFR za optimálních podmínek je u chimérické, přetvořené i murinní protilátky stejná. Kromě toho, přetvořené humánní protilátky 425 jsou při terapeutickém použití u lidí účinnější než myši nebo chimérická protilátka 425. Díky velkému snížení imunogenicity vykazuje přetvořená humánní protilátka 425 v lidském těle delší poločas životnosti a pravděpodobnost, že u humánního pacienta způsobí nežádoucí imunologickou odpověď, je snížena na nejnižší míru.

Výsledky dosažené s definovanou protilátkou MAb 425 ukazují, že humanizované monoklonální protilátky, obsahující umělou konvenční sekvenci, nezpůsobují pozoruhodnou minimální odpověď. Další výhody vynálezu jsou popsány výše.

Na základě výše uvedeného popisu je možno konstatovat, že hodnota nových protilátek pole vynálezu pro terapeutické a diagnostické účely je mimořádně vysoká.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Molekulární klonování a sekvenování

Z buněčné linie W 425–15 (ACCT HB 9629), která produkuje protilátku MAb 425, se izoluje veškerá RNA. Pro produkci veškeré RNA se použije přibližně $9,6 \times 10^7$ buněk, za použití metody s guanidinium–CsCl (Chirgwin a další (1979), Biochemistry 18, 5294). Supernatanty z buněk, které byly použity pro izolaci veškeré RNA, se zkoušejí metodou ELISA, aby se zajistilo, že buňky produkují ve vysokých množstvích správnou protilátku MAb. Připraví se poly(A)⁺RNA (viz Aviv a Leder (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408).

Dvouvláknová cDNA se syntetizuje v podstatě způsoby, popsány v publikaci Gubler a Hoffman (1983), Gene 25, 263, pouze s tím rozdílem, že se pro zahájení syntézy prvního vlákna použije primerů, které jsou homologické s 5'– oblastmi myších kappa a gamma–2a'immunoglobulinových konstantních oblastí (viz Levy a další (1987), Gene 54, 167). Primer lehkého řetězce je 26–mer (oligonukleotid 1, tabulka I), který byl sestaven na základě publikovaných dat (Levy a další (1987), Gene 54, 167; Kaariten a další (1983), J. Immunol. 130, 937). Primer těžkého řetězce je 25–mer (oligonukleotid 2, tabulka I), který byl sestaven na základě publikovaných dat (Kaariten a další (1983) J. Immunol. 130, 937; Kabat a další (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, US

Government Printing Offices. Primery byly navrženy a syntetizovány pomocí zařízení Applied Biosystems 380B DNA Synthesizer a přečištěny na močovino-akryl-amidových gelech. Po syntéze druhého vlákna se tupě zakončené cDNA klonují do SmaI-štěpeného pUC18 (obchodně dostupný produkt) a transformují do kompetentních buněk *E. coli*, například DH5-alfa (obchodně dostupný produkt). Kolonie se pomocí mřížky přenesou na agarové misky a provede se skríníng hybridizací za použití ^{32}P -značených primerů pro syntézu prvního vlákna (Carter a další (1985), *Oligonucleotide Sitedirected Mutagenesis in M 13, an Experimental Approach Manual*, Anglian Biotechnology Ltd. Colchester). Sekvenování dvouvláknové plazmidové DNA se provádí za použití Sequenase (United States Biochemical Corporation).

Příklad 2

Konstrukce chimérických genů

Pro každou variabilní oblast se syntetizuje přední 5'a zadní 3'primer pro PCR reakci (řetězová reakce pomocí polymerázy) (oligonukleotidy 3 až 6, viz tabulka I). Reakce PCR se provádí za použití 1 ng DNA z plazmidu pUC18, obsahující klonovanou cDNA, předního a zadního PCR primeru, z nichž každý je přítomen v konečné koncentraci 1 μM , vždy 200 μM DNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl a 0,1 g/l želatiny. Na každé stanovení se přidá 2,5 jednotky polymerázy DNA Amplitaq (Perkin Elmer Cetus). Po počátečním 1,5 minutovém tavení při 94 °C se provede 25 cyklů amplifikace při 94 °C po dobu 1 minuty, 45 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 3 minut. Závěrečný prodlužovací stupeň při 72 °C se provádí po dobu 10 minut. PCR reakční směsi se dvakrát extrahují směsí fenolu a chloroformu, provede se srážení ethanolem a potom štěpení produktu HindIII a BamHI. Fragment PCR, kódující oblast V_L nebo V_H , se potom klonuje do expresního vektoru. Tento vektor obsahuje enhancer a promotor z HCMV (humánní cytomelovirus), bakteriální neo gen a počátek replikace SV40. Vloží se 2,0Kb BamHI fragment genomové DNA, kódující humánní gamma-1 konstantní oblast (Takahashi a další (1982), *Cell* 29, 671), ve správné orientaci ve směru za V_H oblastí fragmentu (viz HCMV-CV_H425-gamma-1 na obr. 1). Tento vektor se později přizpůsobí odstraněním místa BamHI u 3'- konce fragmentu konstantní oblasti, čímž se umožní, aby byly variabilní oblasti přímo vloženy do expresního vektoru těžkého řetězce, jako HindIII-BamHI fragmenty (Maeda a další (1991), *Hum. Antibod. Hybridomas* 2, 124). Fragment, kódující oblast V_L , se vloží do podobného HCMV expresního vektoru, který v tomto případě obsahuje BamHI fragment genomové DNA, přibližně o velikosti 2,6 Kb, který kóduje humánní kappa konstantní oblast a obsahuje akceptorové místo pro sestřih a poly-(A⁺) (Rabbitts a další (1984), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 113, 166) (viz HCMV-CV_L425-kappa na obr. 1).

Příklad 3

Molekulární modelování V_L a V_H MAb 425

Molekulární model variabilních oblastí murinní protilátky MAb 425 byl vytvořen na základě vyřešené struktury vysoce homologické anti-lysozymové protilátky HyHEL-5 (Sheriff a další (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 8075). Variabilní oblasti protilátek MAb 425 a HyHEL-5 vykazují přibližně 95% homologii.

Model byl vytvořen na zařízení Silicon Graphics Iris 4D workstation running UNIX za použití programovacího balíku pro modelování molekul „QUANTA“ (Polygen Corp). Identické zbytky ve struktuře byly zachovány a neidentické zbytky byly nahrazeny za použití maximálního překrývání („maximum overlap“, Snow a Amzel (1986)), které bylo zavedeno do zařízení pro modelování proteinů „QUANTA“. Konformace hlavního řetězce tří N-terminálních zbytků

- v těžkém řetězci byly nahrazeny z homologické protilátkové struktury (HyHEL-10, Padlan a další (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 5938), poněvadž jejich teplotní faktory byly abnormálně vysoké (vyšší než střed plus tři směrodatné odchylky, měřeno od teplotních faktorů hlavního řetězce) a poněvadž ovlivňovaly sbalování V_H CDR-3 (H3) (Martin (1990), disertační práce na doktorát filosofie na Oxfordské univerzitě). Sekvence CDR-1 (L1) a CDR-2 (L2) oblasti V_L a sekvence CDR-1 (H1) a CDR-2 (H2) oblasti V_H z protilátky MAb 425 odpovídají kanonickým formám, které postulovali Chothia a další (1989), *Nature* 342, 877). Hlavní úhly torze řetězců těchto smyček byly udržovány tak jako v HyHEL-5. Sekvence CDR-3 (L3) oblasti V_L a sekvence CDR-3 (H3) oblasti V_H z protilátky MAb 425 neodpovídají kanonickým strukturám, a proto byly modelovány odlišným způsobem. Bylo použito počítačového programu Martina a dalších (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 9268) pro extrakci smyček z Brookhavenovy databanky (Bernstein a další, (1977), *J. Mol. Bio* 112, 525). Smyčky byly potom vytříběny na základě podobnosti sekvence, energie a zbytků, určujících strukturu (Sutcliffe (1988), disertační práce na doktorát filosofie na Londýnské univerzitě). Kvalitní smyčky byly kontrolovány na grafice a nejlepší z nich byly vybrány na základě vizuálního pozorování. H3 byl modelován na hovězí glutathion peroxidase (Epp a další (1983), *Eur. J. Biochem.* 133, 51) v oblasti zbytků 92 až 103. L3 byl modelován na murinní IgA (J539) Fab fragmentu (Suh a další (1986), *Proteins* 1, 74) v oblasti zbytků 88 až 96 lehkého řetězce.
- Model byl podroben minimalizaci energie nejstrmějšími poklesy a konjugátovými gradienty za použití potenciálu CHARm (Brooks a další (1983), *J. Comp. Chem.* 4, 187), zakomponovaným do QUANTA, aby se odstranily nežádoucí kontakty atomů a aby se optimalizovaly Van der Waalsovy a elektrostatické interakce.

Příklad 4

Konstrukce genů humanizované protilátky

- Konstrukce první verze lehkého řetězce přetvořené humánní protilátky 425 byla prováděna za použití CDR-roubovacího postupu, který se podobá postupu, popsanému v Reichmann a další (1988), *Nature* 322, 21; Verhoeven a další (1988), *Science* 239, 18). Jednovláknová templátová DNA byla připravena z vektoru M13mp18 (který je obchodně dostupný), obsahujícího fragment HinDIII-BamHI, kódující humánní anti-lysozymovou oblast V_L (EP 239 400, G. Winter). FRs tohoto lehkého řetězce jsou odvozeny z krystalograficky vyřešeného proteinu REI. Byly navrženy tři oligonukleotidy, které sestávaly ze sekvencí DNA, kódujících každou CDR lehkého řetězce myši protilátky MAb 425, lemelových na každém konci 12 bázemi DNA, komplementární sekvencím DNA, kódujícím sousední FRs humánního REI (oligonukleotidy 7 až 9 v tabulce I). Oligonukleotidy byly syntetizovány a purifikovány shora uvedeným způsobem.
- Všechny tři oligonukleotidy byly fosforylovány a současně použity v systému pro mutagenезi in vitro, zaměřenou na oligonukleotidy. Použitý systém je složen na metodách, které vypracovali Eckstein a jeho spolupracovníci (Taylor a další (1985), *Nucleic Acids Res.* 13, strana 8749 a 8764; Nakamaye a Eckstein (1986), *Nucleic Res.* 14, 9679; Sayers a další (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 791). Až do exonukleázového III štěpícího stupně bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Potom byla reakční směs extrahována směsí fenolu a chloroformu, produkt byl sražen ethanolem a resuspendován ve 100 μ l TE. Objemu 10 μ l bylo použito jako templátové DNA při 100 μ l PCR amplifikační reakci za použití univerzálního primeru M13 a reverzního sekvenčního primeru až do koncové koncentrace každé z těchto látek 0,2 μ M. Pufrovací a termocyklové podmínky byly stejné jako v příkladu 2 s výjimkou toho, že bylo použito hybridizační teploty 55 °C. Reakční směs byla dvakrát extrahována směsí fenolu a chloroformu, produkt byl sražen ethanolem a potom štěpen HindIII a BamHI a subklonován do pUC18. Předpokládané pozitivní klony byly identifikovány hybridizací k 32 P – značeným mutagenním primerům (Carter a další (1987), viz výše uvedená citace). Klony byly potvrzeny jako pozitivní

sekvenováním. Oblast V_L , obsahující všechny tři roubované CDR, byla klonována jako fragment HindIII–BamHI do expresního vektoru V_L , za vzniku plazmidu HCMV– $RV_{La}425$ –kappa.

Verze „b“ přetvořené oblasti V_L byla konstruována za použití metody PCR mutagenese (Kammann a další (1989), *Nucleic Acids Res.* 17, 5404) s menšími modifikacemi. Templátovou DNA byla RV_L a subklonovaná do pUC18. První PCR reakce byla prováděna v celkovém objemu 50 μ l a reakční směs obsahovala jeden μ g templátu, M13 reverzní sekvenční primer a primer 10 (tabulka I) o konečné koncentraci 1 μ M, 200 μ M každé dNTP, 10 mM Tris–HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl a 0,1 g/l želatiny. Ke každému stanovení byla přidána jedna jednotka DNA polymerázy Amplitaq. Reakce byla prováděna se třemi replikacemi. Po 1,5 minutovém tavení při 94 °C následovalo 40 reakčních cyklů 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 37 °C a 2 minuty při 72 °C. Nakonec bylo provedeno prodlužování po dobu 10 minut při 72 °C. Reakční produkty byly spojeny a extrahovány směsí fenolu a chloroformu. Před izolací PCR produktu z TAE agarosového gelu byl produkt sražen ethanolem. Jedné desetiny prvního PCR reakčního produktu se potom použilo jako jednoho z primerů při druhé PCR reakci. Druhá reakce byla stejná jako první, s výjimkou použití prvního reakčního produktu a 20 pmol univerzálního primeru M13. Cyklování bylo prováděno způsobem, popsaným v publikaci Kammann a další (1989) *Nucleic Acids Res* 17, 5404). Fragment HindIII–BamHI byl klonován do p–UC18 a sekvenován. Fragment DNA, nesoucí požadovanou změnu, byl subklonován do V_L expresního plazmidu za vzniku plazmidu HCMV– $RV_{Lb}425$ –kappa.

První verze přetvořené humánní oblasti V_H protilátky 425 byla syntetizována chemicky. Byla sestrojena DNA sekvence, kódující požadovanou sekvenci aminokyselin a obsahující potřebné lemovací sekvence DNA (viz výše). Použití kodonu bylo optimalizováno pro savčí buňky zabudováním užitečných míst pro restriční enzymy do sekvencí DNA, kódujících FRs. Byl syntetizován úsek o velikosti 454 bp a subklonován do pUC18, jako EcoRI–HindIII fragment. Potom byl HindIII–BamHI fragment, kódující těžký řetězec přetvořené humanizované protilátky 425, přenesen do V_H expresního vektoru, za vzniku plazmidu HCMV– $RV_{Ha}425$ –gamma–1.

Různými způsoby byly zkonstruovány další verze (celkem 8) přetvořených humanizovaných těžkých řetězců. Fragment HindIII–BamHI, kódující verzi „a“ těžkého řetězce, byl přenesen do M13mp18 a byla připravena jednovláknová DNA. Za použití oligonukleotidů 11 až 13 (viz tabulka I) byla výše popsanou PCR–přízpůsobenou M13 mutagenézí, popsanou výše, připravena DNA, kódující verze „d“, „e“, „f“ a „g“ oblastí V_H přetvořené humánní protilátky 425 v pUC18. Tyto verze byly subklonovány do expresního vektoru těžkého řetězce jako fragmenty HindIII–BamHI, za vzniku plazmidů HCMV– $RV_{Hd}425$ –gamma–1, HCMV– $RV_{He}425$ –gamma–1, HCMV– $RV_{Hf}425$ –gamma–1 a HCMV– $RV_{Hg}425$ –gamma–1.

Verze „b“ a „c“ oblastí V_H přetvořené humánní protilátky 425 byly vytvořeny za použití PCR mutagenese, kterou popsali Kammann a další (1989), viz výše uvedená citace. Jako templátová DNA bylo použito verze „a“ oblastí V_H humánní protilátky 425, subklonované do pUC18, a jako mutagenního primeru bylo při první PCR reakci použito buď primeru 13 nebo 14 (viz tabulka I). Po mutagenезi a sekvenování byly sekvence, nesoucí požadované změny, subklonovány do expresního plazmidu těžkého řetězce, za vzniku plazmidů HCMV– $RV_{Hb}425$ –gamma–1 a HCMV– $RV_{Hc}425$ –gamma–1.

Přetvořené verze „h“ a „i“ těžkého řetězce byly zkonstruovány z klonů existujících verzí na bázi pUC. 0,2 Kb fragment HindIII–XhoI z verze „e“ byl ligován k 2,8 Kb fragmentu XhoI–HindIII buď z verze „b“ nebo „c“, za vzniku nových verzí „h“ a „i“. Fragmenty HindIII–BamHI, kódující tyto verze, byly subklonovány do expresního faktoru těžkého řetězce za vzniku HCMV– $RV_{Hh}425$ –gamma–1 a HCMV– $RV_{Hi}425$ –gamma–1.

Příklad 5

Transfekce DNA do buněk COS

5 Buňky COS byly elektroporovány vždy 10 µg expresního vektoru, nesoucího jednak gen, kódující těžký řetězec, a jednak gen, kódující lehký řetězec. Krátce řečeno, 10 µg každého plazmidu bylo přidáno k 0,8 ml alikvotního dílu suspenze buněk COS v PBS o koncentraci 1×10^7 buněk na ml. Bylo použito zařízení Bio-Rad^(R) Gene Pulser pro dodání pulzu 1900 V s kapacitou 25 µF. Buňky byly ponechány zotavit se v průběhu 10 minut při teplotě místnosti a potom byly nanесeny na misky do 8 ml DMEM s obsahem 10 % fetálního telecího séra. Po 72 hodinách inkubace byla média shromážděna, zbavena úlomků buněk odstředěním a před provedením analýzy metodou ELISA byla uložena za sterilních podmínek krátkou dobu při 4 °C nebo delší dobu při -20 °C.

15

Příklad 6

Transfekce DNA do buněk CHO byla prováděna způsobem popsaným v příkladu 5.

20

Příklad 7

Kvantifikace produkce IgG a detekce vazby antigenu

25 Humánní IgG, přítomný v supernatantech z buněk COS, byl detekován metodou ELISA. Při stanovení humánního IgG testem ELISA byly plotny s 96 jamkami povlečeny kozím anti-humánním IgG (celé molekuly) a humánní IgG ve vzorcích, který se navázal na plotny, byl detekován za použití alkalickou fosfatázou konjugovaného kozího anti-humánního IgG (specifického vůči gamma-řetězcům). Jako standardu bylo použito zakoupeného přečištěného humánního IgG. Vazba antigenu, rozpoznaná protilátkou MAb 425, byla stanovena druhým testem ELISA. Plotny byly povlečeny EGFR proteinovým přípravkem (který lze získat například způsobem, popsaným v publikaci Rodeck a další (1987), Cancer Res. 47, 3692), a protilátky, vázající se k EGFR, byly detekovány za použití buď anti-humánní IgG (specifického vůči gamma-řetězcům) peroxidázového konjugátu (v případě chimérických a přetvořených humánních protilátek), nebo za použití anti-myši IgG (celá molekula) peroxidázového konjugátu (v případě myši protilátky MAb 425). Oba konjugáty byly dodány firmou Sigma. Purifikovaná murinní protilátky MAb 425 bylo použito jako standardu.

40

Příklad 8

Konkurenční vazebná zkouška

45 Murinní protilátka MAb 425 byla biotinylována za použití odpovídající soupravy, která je k dostání na trhu. Plotny pro test ELISA byly povlečeny EGFR proteinem v optimálním zředění. Zředěné supernatanty buněk COS v objemu 50 µl byly smísены s 50 µl biotinylované murinní protilátky MAb 425 (o koncentraci podle testu ELISA 1,75 µg/ml). Každý supernatant z buněk COS byl zkoušen dvakrát. Plotny byly inkubovány přes noc při teplotě místnosti. Vázaná biotinylovaná murinní protilátka MAb 425 byla detekována přidavkem komplexu streptavidin-peroxidáza z ředkve, kterýžto komplex je k dostání na trhu. Kontrolní pokus, při němž není přítomna žádná konkurenční látka, vedl k hodnotě procenta inhibice nebo blokování, již lze vypočítat pro každý supernatant buněk COS pole následujícího vzorce:

50

$$100 - [(OD_{450} \text{ vzorku} / OD_{450} \text{ kontrolního vzorku}) \times 100]$$

Příklad 9

5

Různé vzorky murinní, přetvořené a chimérické protilátky MAb 425 byly analyzovány metodou SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide-Gelspaceelectrophoresis), kterou popsali Laemmli a další. Do každé jamky bylo nanášeno 2,5 µg každého vzorku jak za neredukujících, tak za redukujících podmínek. Protein byl vizualizován barvením Coomassie. Obr. 9 (A) ukazuje, že vzorky měly podobnou čistotu. Rozmezí molekulové hmotnosti protilátek bylo 180 000 až 200 000.

10

Příklad 10

15

Přetvořená protilátka MAb 425 byla purifikována gelovou prostorovou filtrací na Superose 12^(R) (Pharmacia Corp., Švédsko) za použití standardních metod. Protilátka byla eluována pomocí PBS (pH 7,4, 0,8 M NaCl) (0,1 M). Je možno získat jediný pík (při 5 minutách) (obr. 9 (B)).

Příklad 11

20

Biotinem značené protilátky MAb 425 bylo použito jako konkurentu neznačené protilátky MAb 425 nebo jejích derivátů při vazbě k EGFR. Značení biotinem bylo provedeno standardními metodami. EGFR byl převeden do roztoku z membrán A431 standardními metodami. Buňky A 431 byly zakoupeny na trhu. Detekce byla prováděna po inkubaci s POD-konjugovaným streptavidinem a substrátem. Z těchto dat byly sestaveny inhibiční křivky (obr. 10). Křivky ukazují, že vazba různých protilátek je srovnatelná.

25

Příklad 12

30

Různé vzorky purifikované murinní, chimérické a přetvořené MAb 425 byly zkoušeny na svou schopnost soutěžit s EGF o vazbu k EGFR. Zkouška byla prováděna za použití ¹²⁵I-značeného EGF (Amersham Corp., Velká Británie) a různých protilátek, které značenému EGF konkurují při vazbě na EGF-receptor pozitivní membrány (A431). Zkušební systém je založen na technologii SPA. Konkurenční křivky murinní a přetvořených protilátek (3 vzorky) jsou téměř identické (obr. 11).

35

40

PATENTOVÉ NÁROKY

45 1. Chimérická monoklonální protilátka, obsahující místa, vázající antigen, CDR, nehumánního původu, úseky základní struktury, FR, nehumánního původu a konstantní oblasti humánního imunoglobulinu, která vykazuje tyto znaky:

i) váže se k humánním receptorům EGF a inhibuje vazbu EGF k receptoru EGF,

50

ii) konstantní oblasti jejího těžkého řetězce zahrnují sekvenci aminokyselin humánního řetězce gamma-1 a konstantní oblasti lehkého řetězce zahrnují sekvenci aminokyselin humánního řetězce kappa,

iii) její oblasti CDR, reprezentující místa, vázající antigen, zahrnují následující sekvence aminokyselin

5 lehký řetězec

CDR-1 –Ser–Ala–Ser–Ser–Ser–Val–Thr–Tyr–Met–Tyr–
 CDR-2 –Asp–Thr–Ser–Asn–Leu–Ala–Ser–
 CDR-3 –Gln–Gln–Trp–Ser–Ser–His–Ile–Phe–Thr–

10

těžký řetězec

CDR-1 –Ser–His–Trp–Met–His–
 CDR-2 –Glu–Phe–Asn–Pro–Ser–Asn–Gly–Arg–Thr–Asn–Tyr–Asn–Glu–Lys–Phe–Lys–Ser–
 15 CDR-3 –Arg–Asp–Tyr–Asp–Tyr–Asp–Gly–Arg–Tyr–Phe–Asp–Tyr–

iv) její úseky základní struktury, FR, variabilní oblasti, která nemá vztah k místům vázajícím antigen, zahrnují následující aminokyselinové sekvence

20 lehký řetězec

FR-1 –Gln–Ile–Val–Leu–Thr–Gln–Ser–Pro–Ala–Ile–Met–Ser–Ala–Ser–Pro–Gly–Glu–Lys–
 Val–Thr–Met–Thr–Cys–
 FR-2 –Trp–Tyr–Gln–Gln–Lys–Pro–Gly–Ser–Ser–Pro–Arg–Leu–Leu–Ile–Tyr–
 25 FR-3 –Gly–Val–Pro–Val–Arg–Phe–Ser–Gly–Ser–Gly–Ser–Gly–Thr–Ser–Tyr–Ser–Leu–Thr–
 Ile–Ser–Arg–Met–Glu–Ala–Glu–Asp–Ala–Ala–Thr–Tyr–Tyr–Cys–
 FR-4 –Phe–Gly–Ser–Gly–Thr–Lys–Leu–Glu–Ile–Lys–

těžký řetězec

30

FR-1 –Gln–Val–Gln–Leu–Gln–Gln–Pro–Gly–Ala–Glu–Leu–Val–Lys–Pro–Gly–Ala–Ser–
 Val–Lys–Leu–Ser–Cys–Lys–Ala–Ser–Gly–Tyr–Thr–Phe–Thr–
 FR-2 –Trp–Val–Lys–Gln–Arg–Ala–Gly–Gln–Gly–Leu–Glu–Trp–Ile–Gly–
 FR-3 –Lys–Ala–Thr–Leu–Thr–Val–Asp–Lys–Ser–Ser–Ser–Thr–Ala–Tyr–Met–Gln–Leu–Ser–
 35 Ser–Leu–Thr–Ser–Glu–Asp–Ser–Ala–Val–Tyr–Tyr–Cys–Ala–Ser–
 FR-4 –Trp–Gly–Gln–Gly–Thr–Thr–Leu–Thr–Val–Ser–Ser–

2. Expresní vektor, obsahující sekvenci DNA, kódující variabilní a konstantní oblast lehkého
 40 řetězce chimérické monoklonální protilátky podle nároku 1, který nese označení pCVL425 a je
 uložen ve sbírce DSM pod přírůstkovým číslem DSM 6338.

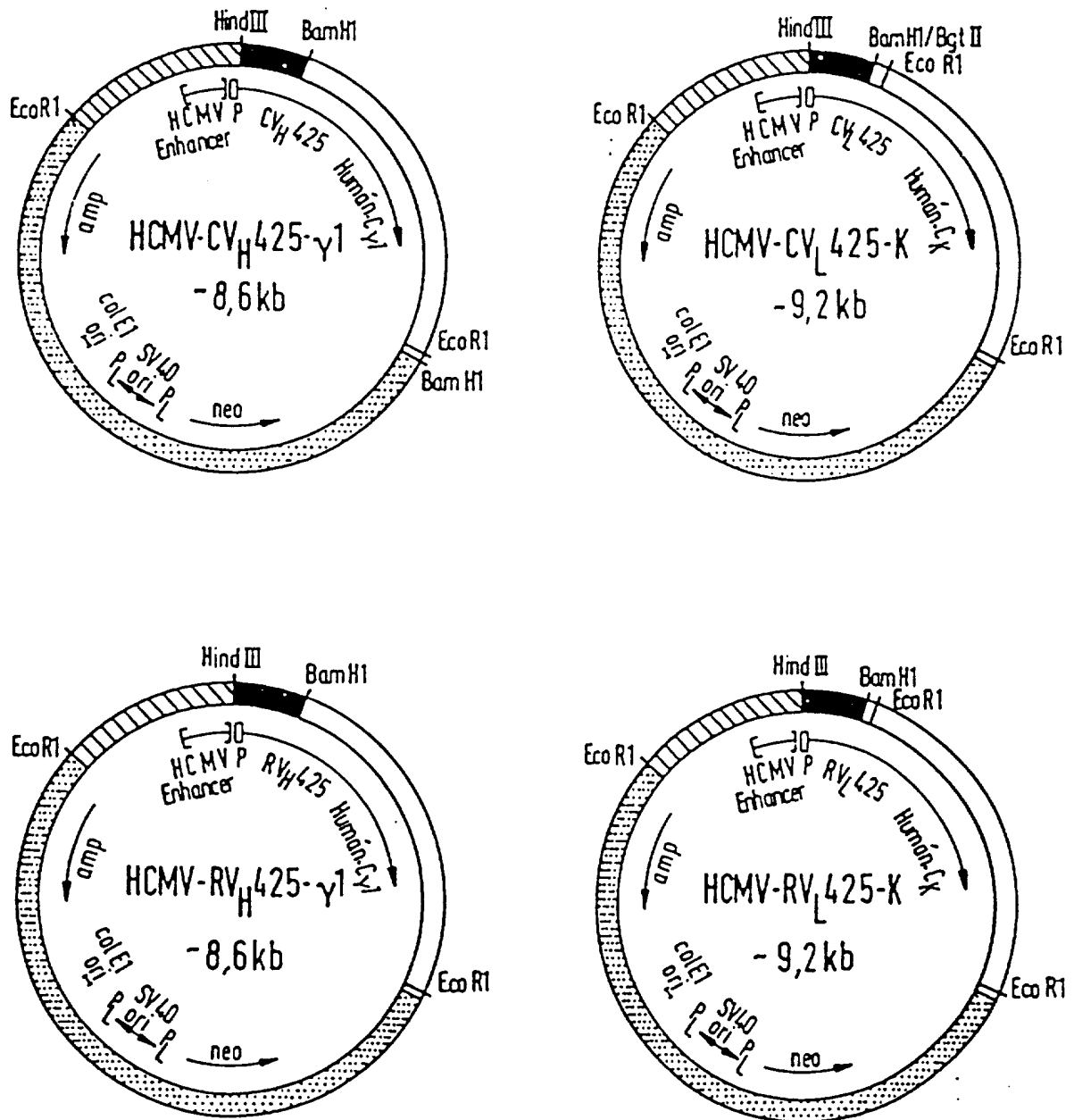
3. Expresní vektor, obsahující sekvenci DNA, kódující variabilní a konstantní oblast těžkého
 řetězce chimérické monoklonální protilátky podle nároku 1, který nese označení pCVH425 a je
 45 uložen ve sbírce DSM pod přírůstkovým číslem DSM 6337.

4. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje monoklonální
 protilátku podle nároku 1.

50

12 výkresů

Obr. 1



Panel A:

5'-----CGAGCTCGG-CTGAGCACACAGGACCTCACCATG GGT TGG AGC TAT 45
 pUC18----->3'-GACTCGTGTGTCTGGAGTGGTACCCA-----5'
 5'-CTCCAAGCTTGACCTCACCATGG-3'
 HindIII Met Gly Trp Ser Tyr

ATC ATC CTC TTT TTG GTA GCA ACA GCT ACA GAT GTC CAC TCC CAG 90
 Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp Val His Ser Gln
 GTC CAG CTG CAA CAA CCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 135
 Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC 180
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr(Ser
 CAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG 225
 His Trp Met His)Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu
 TGG ATC GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT 270
 Trp Ile Gly(Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 GAG AAA TTC AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC 315
 Glu Lys Phe Lys Ser)Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT 360
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 GCG GTC TAT TAC TGT GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG 405
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser(Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg

3'-AG TGT CAG AGG AGT
 TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 450
 Tyr Phe Asp Tyr)Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

CCACTCACCTAGGTT-5' <---- pUC18
 GCCAAAACAACACCCCATCGGTCTATCCACTGGAT-TCCTCTAGAGTCGACC---3' 501

Panel B:

--- pUC18 ----->
 5'-----TTCGAGCTCGGTACCC-ACAAAATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC 45
 3'-----AAGCTCGAGCCATGGG-TGTTTTAC CTA AAA GTT CAC GTC--5'
 5'-AGAAAGCTT-CCACCATG GAT TTT CAA GTG-3'
 HindIII Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe

AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA GTC ATA CTG TCC AGA GGA CAA 90
 Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln
 ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG 135
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 GAG AAG GTC ACT ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA ACT TAC 180
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys(Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr
 ATG TAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG 225
 Met Tyr)Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu
 ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGT TTC 270
 Ile Tyr(Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser)Gly Val Pro Val Arg Phe
 AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA 315
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT 360
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys(Gln Gln Trp Ser

3'-C AAC CTT TAT TTT
 AGT CAC ATA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA 405
 Ser His Ile Phe Thr)Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 GCACTCATCTAGATG-5' SgIII <-- pUC18
 CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATGGATCTTCCCACCATCCAGGATCC-GGGGATCC-3' 462

Obr. 3

5' --															3'														
AAGCTTGCCGCCACC															ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG														
															Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu														
CTC GCC GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC															CAG GTG CAA CTA GTG CAG														
Leu Ala Val Ala Pro Gly Ala His Ser															Gln Val Gln Leu Val Gln														
TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA CCC GGT															GCT TCC GTG AAG GTG AGC														
Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly															Ala Ser Val Lys Val Ser														
TGT AAA GCT AGC GGT TAT ACC TTC TCT															TCC CAC TGG ATG CAT TGG														
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser															(Ser His Trp Met His) Trp														
GTT AGA CAG GCC CCA GGC CAA GGG CTC															GAG TGG GTG GGC GAG TTC														
Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu															Glu Trp Val Gly (Glu Phe														
AAC CCT TCA AAT GGC CGG ACA AAT TAT															AAC GAG AAG TTT AAG AGC														
Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr															Asn Glu Lys Phe Lys Ser)														
AGG GTT ACC ATG ACC TTG GAC ACC TCT															ACA AAC ACC GCC TAC ATG														
Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser															Thr Asn Thr Ala Tyr Met														
GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC															ACT GCA GTC TAC TAC TGC														
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp															Thr Ala Val Tyr Tyr Cys														
GCC TCA CGG GAT TAC GAT TAC GAT GGC															AGA TAC TTC GAC TAT TGG														
Ala Ser (Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly															Arg Tyr Phe Asp Tyr) Trp														
GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT															TCA GGTGAGTGGATCCGAATTC														
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser															Ser Ser														

Qbr. 4-1

Panel A:

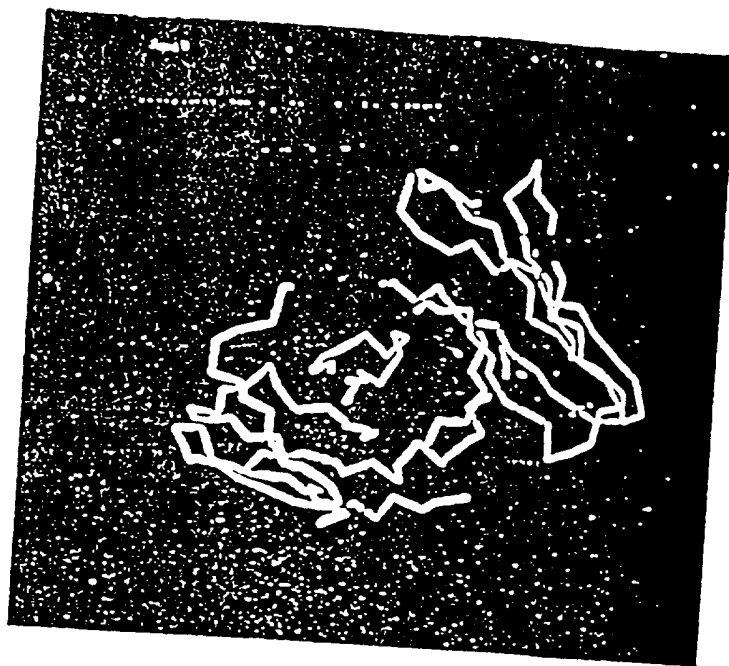
V _L 425	Gln-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ile-	
RV _L a425	Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Ser-	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Met-Ser-Ala-Ser-Pro-Gly-Glu-Lys-Val-Thr-	<u>FR-1</u>
RV _L a425	Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val-Thr-	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Met-Thr-Cys	
RV _L a425	Ile-Thr-Cys	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Thr-Tyr-Met-Tyr	<u>CDR-1</u>
RV _L a425	Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Thr-Tyr-Met-Tyr	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Ser-Ser-Pro-	
RV _L a425	Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Lys-Ala-Pro-	
RV _L b425	-----	<u>FR-2</u>
V _L 425	Arg-Leu-Leu-Ile-Tyr	
RV _L a425	Lys-Leu-Leu-Ile-Tyr	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Asp-Thr-Ser-Asn-Leu-Ala-Ser	
RV _L a425	Asp-Thr-Ser-Asn-Leu-Ala-Ser	<u>CDR-2</u>
RV _L b425	-----	
V _L 425	Gly-Val-Pro-Val-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-	
RV _L a425	Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr-Ser-Leu-Thr-Ile-Ser-	<u>FR-3</u>
RV _L a425	Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Phe-Thr-Ile-Ser-	
RV _L b425	-----Tyr-----	
V _L 425	Arg-Met-Glu-Ala-Glu-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys	
RV _L a425	Ser-Leu-Gln-Pro-Glu-Asp-Ile-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys	
RV _L b425	-----	
V _L 425	Gln-Gln-Trp-Ser-Ser-His-Ile-Phe-Thr	
RV _L a425	Gln-Gln-Trp-Ser-Ser-His-Ile-Phe-Thr	<u>CDR-3</u>
RV _L b425	-----	
V _L 425	Phe-Gly-Ser-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys	
RV _L a425	Phe-Gly-Gln-Gly-Thr-Lys-Val-Glu-Ile-Lys	<u>FR-4</u>
RV _L b425	-----	

Obr: 4-2

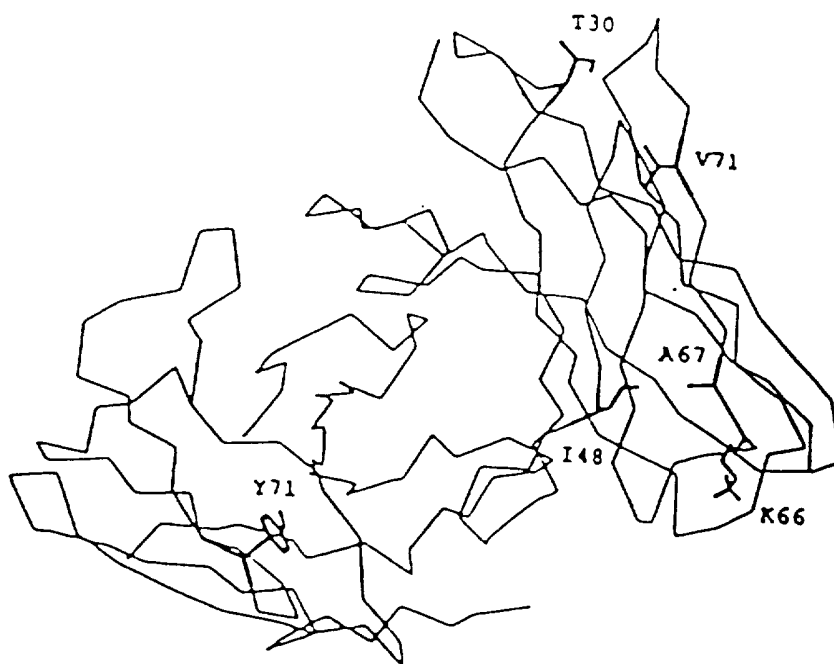
Panel B:

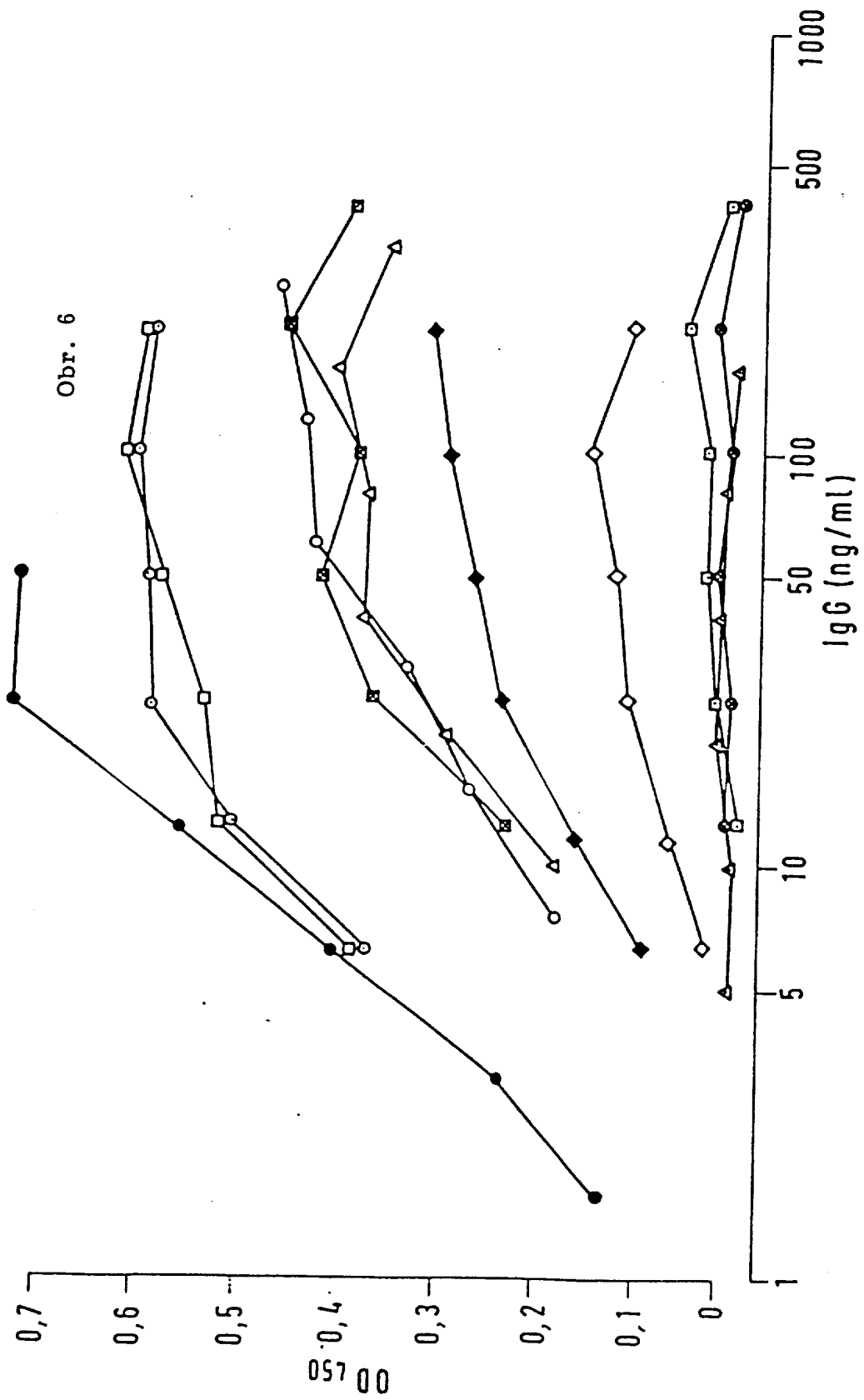
V _H 425	Gln-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Pro-Gly-Ala-Glu-	
RV _H a-d, f425	Gln-Val-Gln-Leu-Val-Gln-Ser-Gly-Ala-Glu-	
RV _H e, g-i425	-----	
V _H 425	Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Leu-	<u>FR-1</u>
RV _H a-d, f425	Val-Lys-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Val-	
RV _H e, g-i425	-----	
V _H 425	Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr	
RV _H a-d, f425	Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Ser	
RV _H e, g-i425	-----Thr	
V _H 425	Ser-His-Trp-Met-His	<u>CDR-1</u>
RV _H a-i425	Ser-His-Trp-Met-His	
V _H 425	Trp-Val-Lys-Gln-Arg-Ala-Gly-Gln-Gly-Leu-	
RV _H a-c, h, i425	Trp-Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-	
RV _H d-g425	-----	
V _H 425	Glu-Trp-Ile-Gly	<u>FR-2</u>
RV _H a-c, h, i425	Glu-Trp-Val-Gly	
RV _H d-g425	-----Ile----	
V _H 425	Glu-Phe-Asn-Pro-Ser-Asn-Gly-Arg-Thr-Asn-	
RV _H a-i425	Glu-Phe-Asn-Pro-Ser-Asn-Gly-Arg-Thr-Asn-	
V _H 425	Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Ser	<u>CDR-2</u>
RV _H a-i425	Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Ser	
V _H 425	Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Ser-	
RV _H a, d, e425	Arg-Val-Thr-Met-Thr-Leu-Asp-Thr-Ser-Thr-	
RV _H b, h425	-----Val-----	
RV _H c, f, g, i425	Lys-Ala-----Val-----	
V _H 425	Ser-Thr-Ala-Tyr-Met-Gln-Leu-Ser-Ser-Leu-	
RV _H a, d, e425	Asn-Thr-Ala-Tyr-Met-Glu-Leu-Ser-Ser-Leu-	<u>FR-3</u>
RV _H a, d, e425	-----	
RV _H c, f, g, i425	-----	
V _H 425	Thr-Ser-Glu-Asp-Ser-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Ser	
RV _H a, d, e425	Arg-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Ser	
RV _H a, d, e425	-----	
RV _H c, f, g, i425	-----	
V _H 425	Arg-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Arg-Tyr-Phe-Asp-Tyr	<u>CDR-3</u>
RV _H a-i425	Arg-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Arg-Tyr-Phe-Asp-Tyr	
V _H 425	Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser	<u>FR-4</u>
RV _H a-i425	Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser	

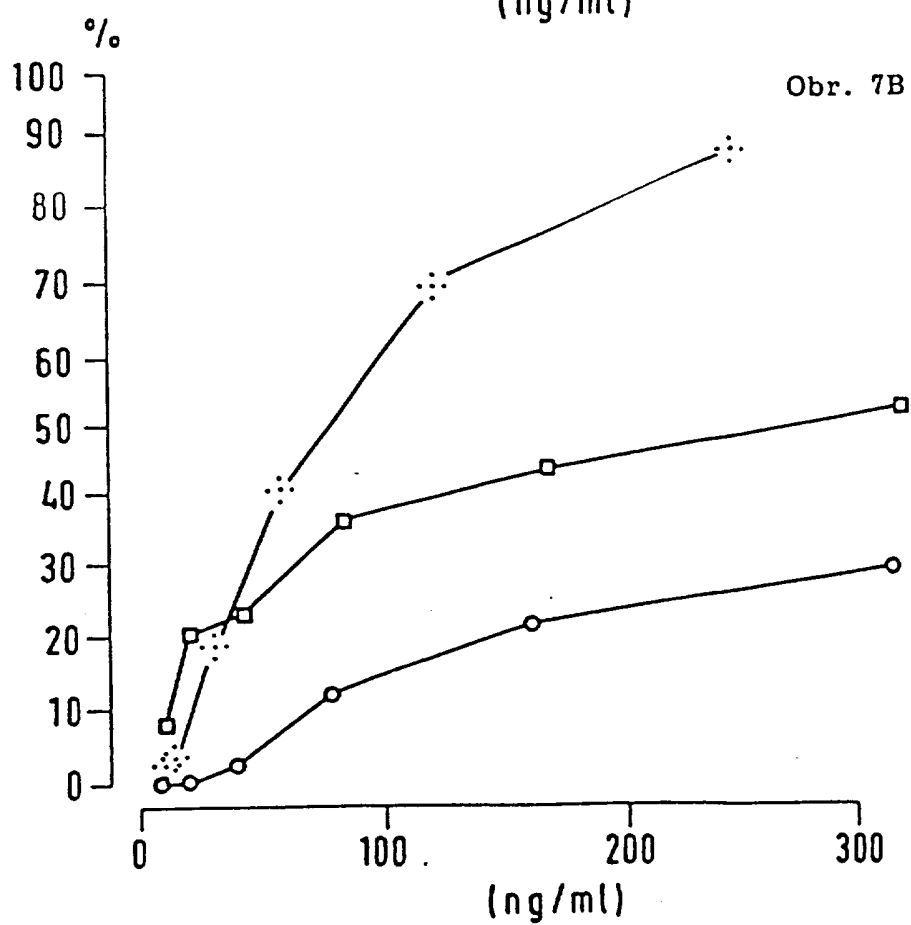
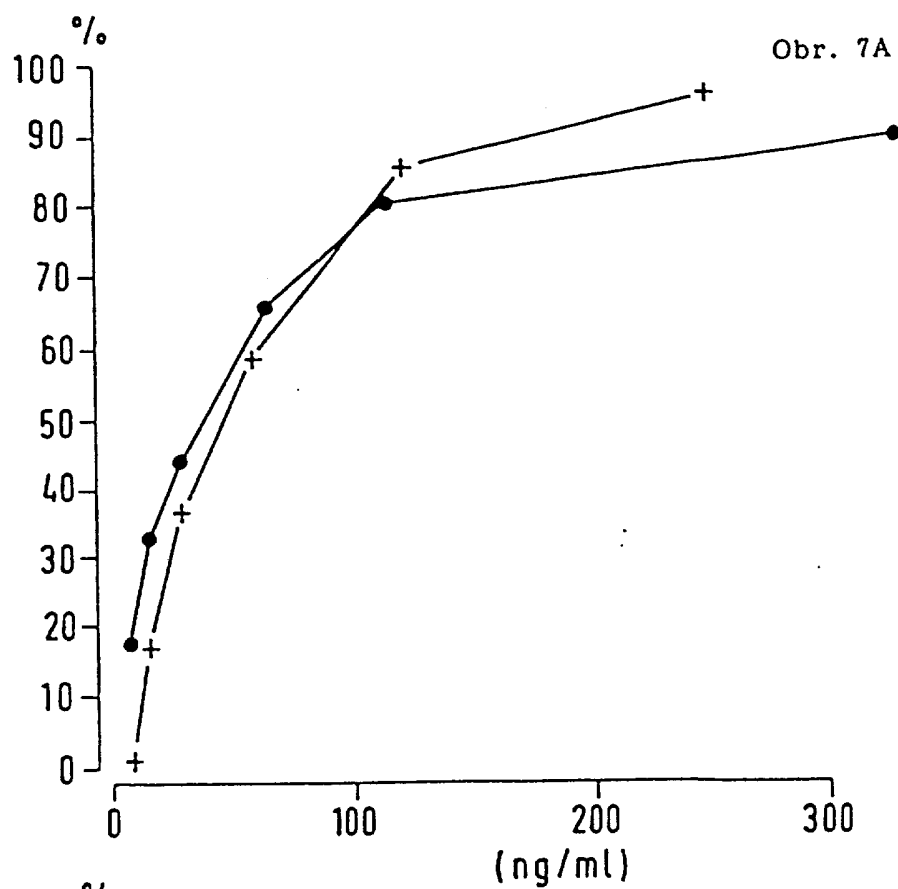
A

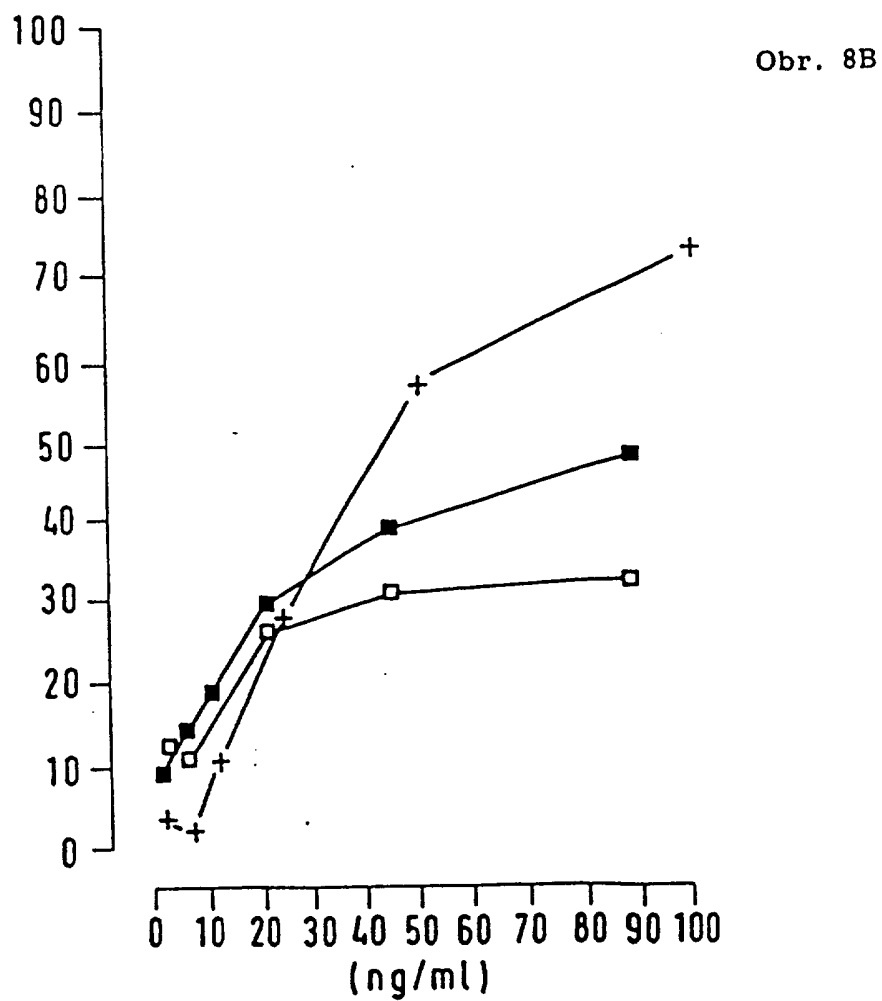
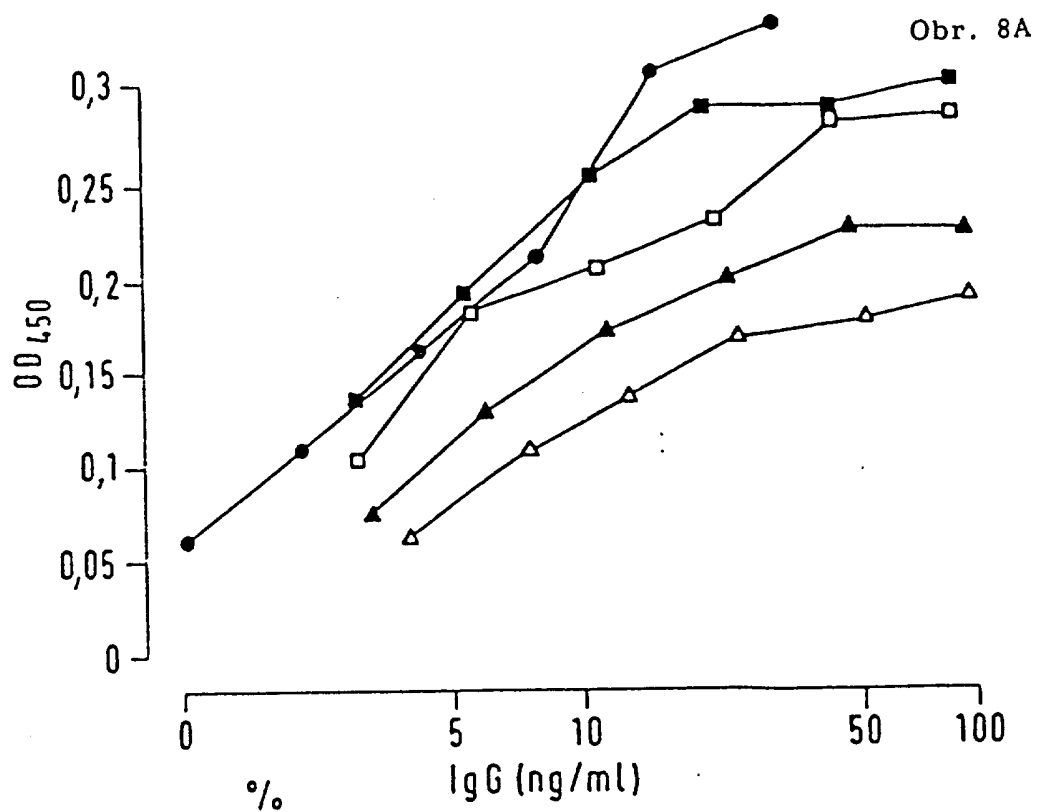


B

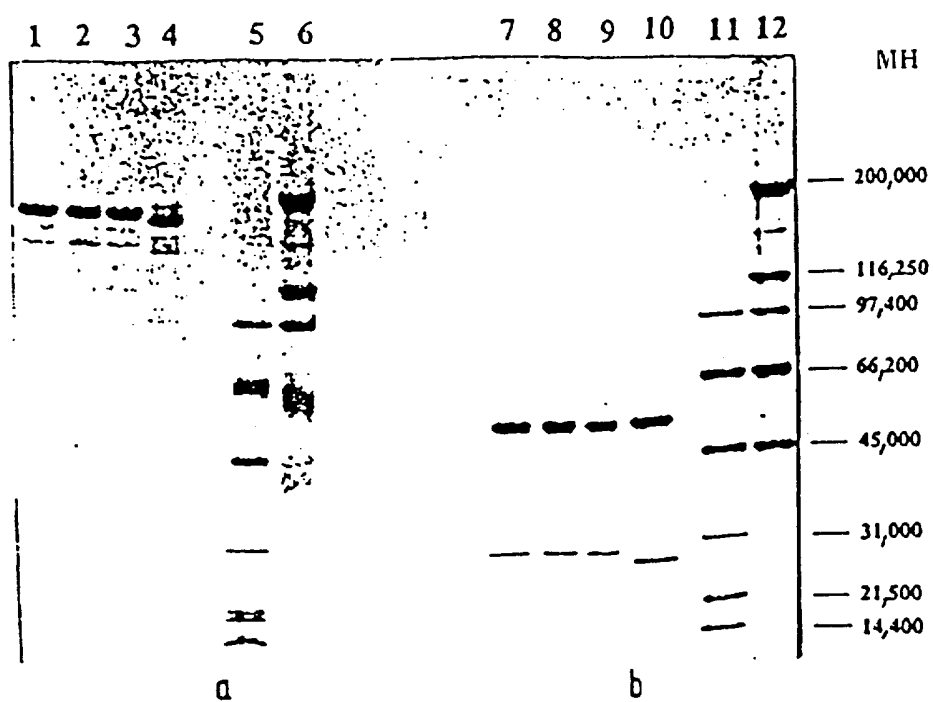




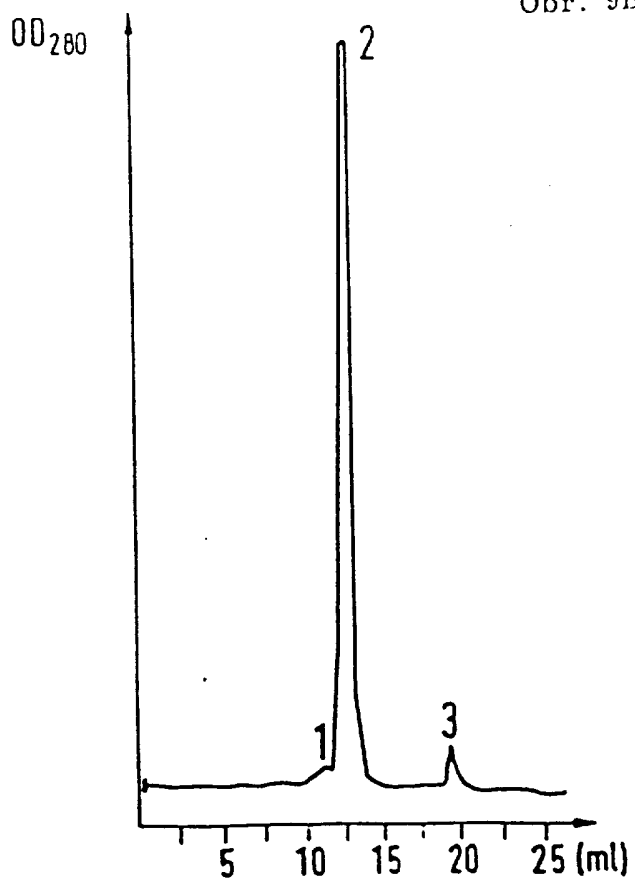


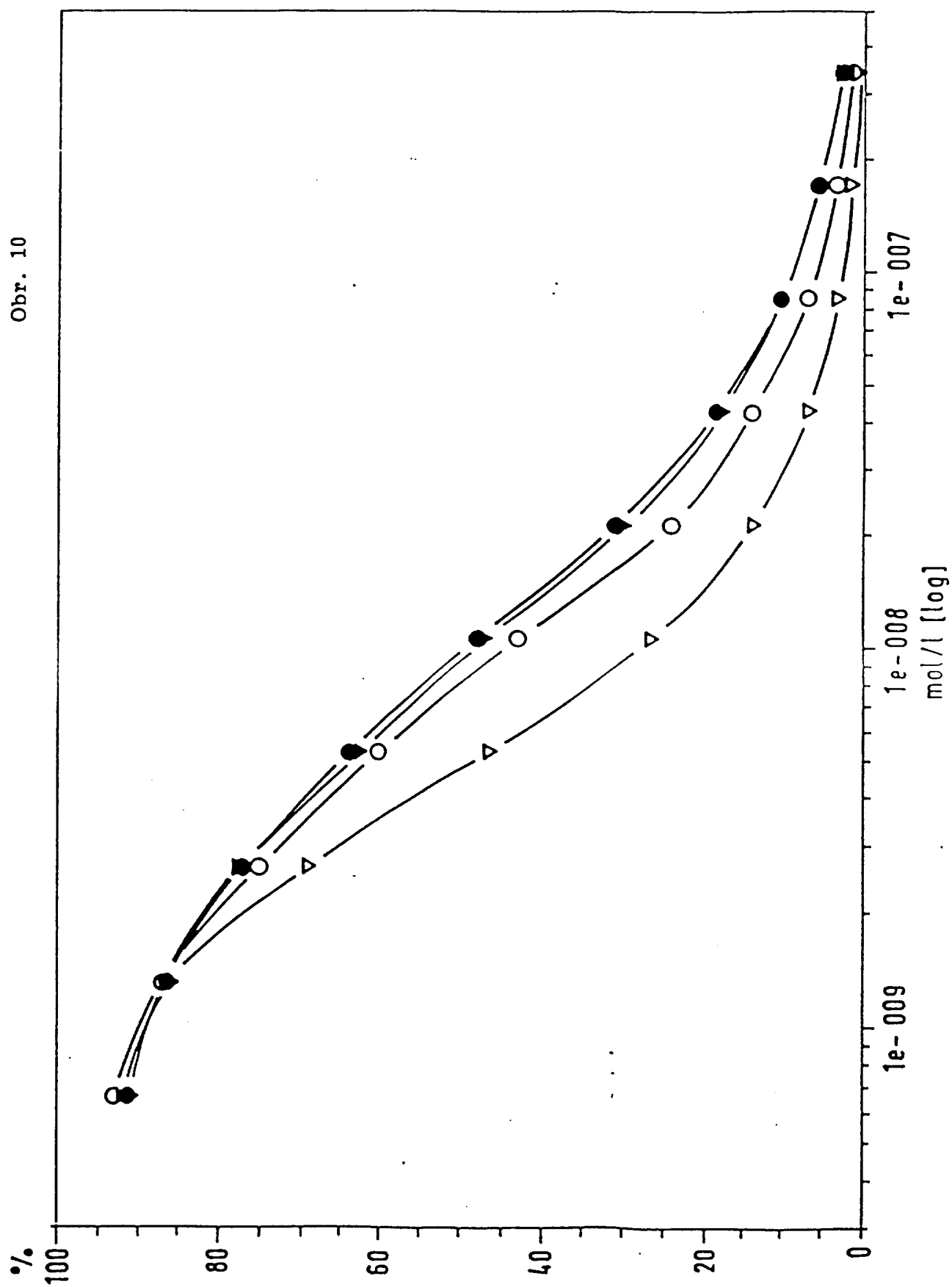


Obr. 9A

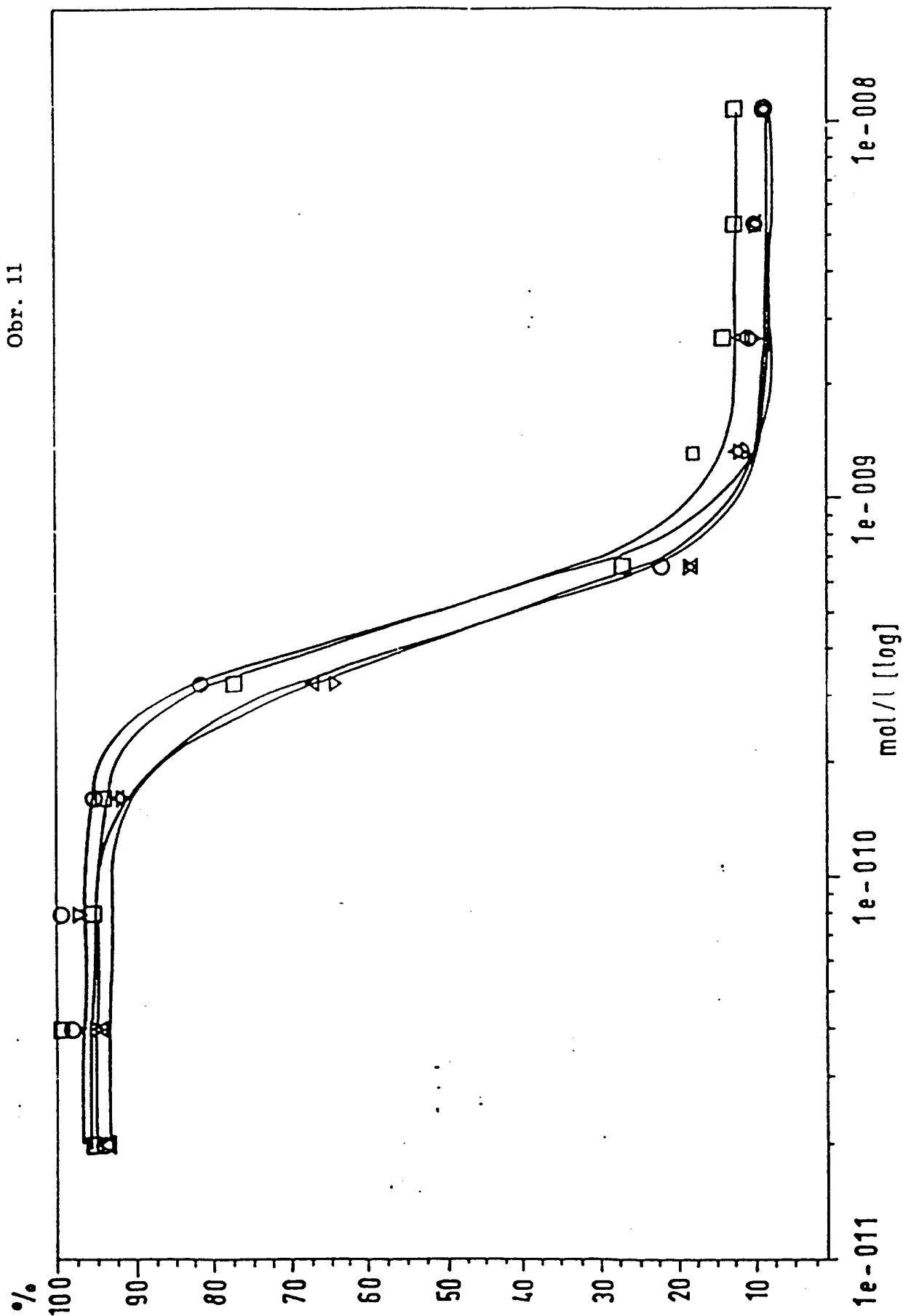


Obr. 9B





Obr. 11



Konec dokumentu