

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.07.2000**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.07.1999**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/192270**  
(33) Země priority: **JP**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.04.2002**  
(Věstník č. 4/2002)  
(86) PCT číslo: **PCT/JP00/04523**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/02012**

(21) Číslo dokumentu:

**2001 - 4730**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 45/00**

**A 61 K 39/395**

**A 61 P 3/14**

**A 61 P 5/18**

(71) Přihlašovatel:  
**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, Tokyo,**  
**JP;**

(72) Původce:  
**Saito Hidemi, Gotenba-shi, JP;**  
**Tsunenari Toshiaki, Gotenba-shi, JP;**  
**Onuma Etsuro, Gotenba-shi, JP;**

(74) Zástupce:  
**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,**  
**14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii**

(57) Anotace:

Předložené řešení poskytuje terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii, která je odolná k lékům. terapeutické činidlo obsahuje jako svou aktivní složku látku schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem podobným hormonu příštítých tělísek (PTHrP) a jeho receptorem.

CZ 2001 - 4730 A3

## Terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká terapeutického činidla pro hyperkalcinémii, která je odolná k lékům, které jako svou aktivní složku obsahuje látku schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem podobným hormonu příštítných tělísek (PTHrP) a receptorem.

### Dosavadní stav techniky

Při lékové terapii (tj. farmakoterapii) humorální hyperkalcinémie zhoubného bujení (HHM), je podávána doplňková infuze močopudného činidla nebo činidla potlačujícího vstřebávání kostní tkáně (například bifosfonát nebo kalcitonin). Současným trendem v lékové terapii je podávání kalcitoninu nebo bifosfonátu samotných nebo kombinace kalcitoninu s bifosfonátem.

Podání kalcitoninu má velmi rychlý nástup působení a terapeutický účinek trvá několik hodin po podání. Kalcitonin je primárně účinný kvůli svému inhibičnímu působení na vstřebávání kostní tkáně. Při aplikování může být kalcitonin pacientovi podáván injekčně nitrosvalově nebo nitrožilně dvakrát denně (ráno a večer), přičemž dávka obsahuje 40 až 80 jednotek.

Bifosfonát je sloučenina, která je účinná pro své velmi silné inhibiční působení na vstřebávání kostní tkáně. Má pomalý nástup působení, který vyžaduje tři až čtyři dny, než je terapeutický účinek plně vyjádřen. Potom je také používána kombinační terapie, sestávající z kalcitoninu a bifosfonátu (který nepůsobí rychle, ale velmi silně inhibičně působí na vstřebávání kostní tkáně).

Bohužel bifosfonát a kalcitonin mohou mít při používání následující omezení.

#### (1) Bifosfonát:

- Třebaže může inhibovat vstřebávání kostní tkáně, nemůže zlepšit vylučování vápníku ledvinami.
- Má pomalý nástup působení, který vyžaduje tři až čtyři dny, než je terapeutický účinek vyjádřen.
- Je nedostatečně účinný u pacientů s vysokými krevními hladinami PTHrP (12 pmol/l nebo vyšší) a má kratší dobu působení.

- Jeho působení se oslabuje, když je podáván opakovaně. Při opakovaném podávání je pak požadováno, aby byl podáván v intervalech alespoň jednoho týdne, aby došlo k udržení odpovědi, indukované počátečním podáním.

- Může někdy způsobit hypokalcinémii.

(2) Kalcitonin:

Jeho účinek na snížení hladin vápníku dosahuje maximum v rozmezí mezi 12 až 24 hodinami po podání. Když je poté provedeno opakované podání, může však účinek vykazat opětný vzestup v rozmezí mezi 4 až 5 dny po podání, což je známo jako tzv. „únikový efekt“.

Z výše vyložených důvodů jsou tyto léky ve svém klinickém působení omezeny kvůli snížené účinnosti, způsobené opakovaným podáváním nebo vývojem odolnosti k lékům. Navíc tyto léky nejsou uspokojivé pro zlepšení stavu pacientů QOL a pacientů HHM.

### Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je poskytnout léčebné činidlo pro hyperkalcinémii, která je odolná k léku, které jako svou aktivní složku obsahuje látku schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem podobným hormonu příštítých tělísek (PTHrP) a jeho receptorem.

Autoři předloženého vynálezu provedli extenzivní a intenzivní studie jak překonat výše uvedené nedostatky. Výsledkem bylo zjištění, že látka schopná inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem může zlepšit hyperkalcinémii, která je odolná k existujícímu terapeutickému činidlu pro hyperkalcinémii, jako jsou činidla inhibující vstřebávání kostní tkáně. Toto zjištění vedlo k provedení vynálezu.

Proto předložený vynález poskytuje terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii, která je odolná k lékům, které jako svou aktivní složku obsahuje látku schopnou inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem. V tomto ohledu hyperkalcinémie, která je odolná k lékům, může být odolná k terapeutickému činidlu pro hyperkalcinémii jinému, než je sloučenina schopná inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem. Látka může být antagonist PTHrP receptoru, protilátka proti PTHrP, která může být monoklonálního nebo polyklonálního typu, s výhodou typu monoklonálního. Monoklonální protilátka může být zušlechtná protilátka, chimerní protilátka, nebo

fragment protilátky a/nebo modifikovaná forma fragmentu. Zušlechťenou protilátkou může být zušlechťená protilátka #23-57-137-1. Hyperkalcinémie, která je odolná k lékům, může být způsobena rakovinou.

Termín „lék“ v případě „hyperkalcinémie, která je odolná k lékům“ zde označuje jakýkoli lék nebo činidlo, pokud je terapeuticky účinný na hyperkalcinémii, jako je činidlo inhibující vstřebávání kostní tkáně, činidlo podporující vylučování vápníku, činidlo inhibující gastrointestinální vstřebávání vápníku a močopudné činidlo.

Termín „hyperkalcinémie, která je odolná k lékům“ zde označuje třídu hyperkalcinémie, která vykazuje odolnost k léku, který má terapeutický účinek na hyperkalcinémii, když je lék podáván opakovaně, jako je např. hyperkalcinémie, která je odolná k činidlu inhibujícímu vstřebávání kostní tkáně, činidlu podporujícímu vylučování vápníku, činidlu inhibujícímu gastrointestinální vstřebávání vápníku a močopudnému činidlu, nejlépe činidlu inhibujícímu vstřebávání kostní tkáně.

Činidlo inhibující vstřebávání kostní tkáně může obsahovat bifosfonát, kalcitonin atd.

Bifosfonát může zahrnovat například alendronat, pamidronat a incadronat.

Kalcitonin může zahrnovat například kalcitonin, elcatonin a lososí kalcitonin.

Činidlo podporující vylučování vápníku může obsahovat kalcitonin a močopudné činidlo.

Činidlo inhibující gastrointestinální vstřebávání vápníku může obsahovat glukokortikoid a anorganický fosfát.

Močopudné činidlo může obsahovat furosemid.

Činidlo inhibující osteoklast může obsahovat protirakovinné činidlo, jako je aktinomycin D, cisplatin a mithramycin.

V dalším bude předložený vynález popsán podrobně.

Tento popis zahrnuje části nebo celé obsahy, které jsou popsány v popisu a/nebo obrázcích japonské patentové přihlášky č. 11-192 270, což je dokument, který má vzhledem k předkládané přihlášce přednostní právo.

Předložený vynález se týká terapeutického činidla pro hyperkalcinémii, která je odolná k léku, který jako svou aktivní složku obsahuje látku schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem, podobajícím se hormonu příštítných tělísek (zde je označován jako „PTHrP“) a jeho receptorem (zde je označován jako „PTHrP receptor“).

Termín „PTHrP receptor“ zde označuje jakýkoli receptor, který se může vázat k PTHrP (jako jsou ty, které jsou popsány v publikaci č. 6-506 598, předložené pro japonskou národní fázi přezkoumání), bez ohledu na to, zda PTHrP receptor je nebo není na cílovém orgánu přítomen (například kost, ledvina).

Termín „látka schopná inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem (PTHrP receptor)“, zde označuje jakoukoli látku, která se může vázat na PTHrP a zabránit tak vazbě PTHrP na PTHrP receptor, jako je protilátka proti PTHrP; jakoukoli látku, která se může vázat na PTHrP receptor a zabránit tak vazbě PTHrP receptoru k PTHrP, jako je antagonist k PTHrP receptoru (PTHrP antagonist), specifický peptid, který obsahuje záměnu nebo delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku v PTHrP peptidu nebo obsahuje částečnou sekvenci PTHrP peptidu; nebo jejich kombinace.

Protilátka proti PTHrP zahrnuje protilátky jakýchkoli známých typů, jako jsou zušlechtěné protilátky, lidská protilátka (WO 96/33 735) nebo chimerní protilátka (japonská patentová přihláška č. 4-228 089), a protilátku produkovanou hybridomem #23-57-137-1 (tj. protilátka 23-57-137-1). Protilátka může být polyklonálního typu nebo monoklonálního typu, výhodný je ale typ monoklonální. Antagonista PTHrP zahrnuje mimo jiné polypeptid nebo látku o nízké molekulové hmotnosti. Příkladem antagonisty PTHrP je látka, která se váže na PTHrP receptor antagonistickým způsobem proti PTHrP, jako je PTHrP (7-34), PTHrP (8-34), PTHrP (9-34), PTHrP (10-34), nebo jeho mutace, která obsahuje záměnu, delecí nebo adici alespoň jednoho aminokyselinového zbytku. Jejich další příklady zahrnují polypeptidy, které mají antagonistickou aktivitu proti PTHrP, jak je popsáno v japonské patentové přihlášce č. 7-165 790; v publikaci č. 5-509 098, předložené pro japonskou národní fázi přezkoumání; Peptides (Spojené státy), 1995, 16(6) 1031-1037; a Biochemistry (Spojené státy), duben 281 992, 31(16) 1026-4033. Tyto polypeptidy mohou mít delecí, záměnu, adici nebo inzerci alespoň jednoho aminokyselinového zbytku, pokud mohou mít ekvivalentní úroveň PTHrP antagonistické aktivity, tyto jsou také zahrnuty mezi PTHrP antagonisty, které jsou předmětem tohoto vynálezu.

V předloženém vynálezu bude dále jako příklad „látky schopné inhibovat vazbu mezi PTHrP a PTHrP receptorem“ popsána protilátka proti PTHrP.

#### 1. Protilátka proti PTHrP

Protilátka proti PTHrP, použitá v předloženém vynálezu, může být jakákoli protilátka, která může vykazat terapeutický účinek na hyperkalcinémii, která je odolná k lékům, bez ohledu na její zdroj, typ (monoklonální nebo polyklonální) a konfiguraci.

Protilátka proti PTHrP, použitá v předloženém vynálezu, může být produkována pomocí jakéhokoli známého postupu jako polyklonální protilátka nebo monoklonální protilátka. Je výhodné, když protilátka proti PTHrP je monoklonální protilátka, odvozená ze savce. Ze savců odvozené monoklonální protilátky zahrnují protilátky vytvářené v hybridomech a protilátky, vytvářené pomocí geneticko-inženýrských postupů v hostiteli, transformovaném pomocí rekombinantního expresního vektoru, který nese gen pro protilátku. Protilátka se může vázat na PTHrP a zabraňovat vazbě PTHrP na PTH/PTHrP receptor, čímž dochází k blokování přenosu signálu PTHrP a následkem toho k potlačení biologické aktivity PTHrP.

Specifickým příkladem takové protilátky je protilátka #23-57-137-1, která může být vytvářena hybridomovým klonem #23-57-137-1.

Hybridomový klon #23-57-137-1 byl označen „hybridom myš-myš #23-57-137-1“ a uložen za podmínek budapeštské smlouvy 15. srpna 1996 v Národním ústavu biologických věd a lidské technologie, Agentura průmyslové vědy a technologie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod přístupovým číslem FERM BP-5631.

## 2. Hybridom produkující protilátku

Hybridom produkující monoklonální protilátku může být vytvořen následujícím způsobem. PTHrP je použit jako antigen pro imunizaci podle běžného imunizačního postupu. Výsledné imunocyty jsou fúzovány se známými rodičovskými buňkami pomocí běžných postupů pro fúzi buněk, a buňky produkující monoklonální protilátku jsou z fúzovaných buněk vytríděny pomocí běžné třídící metody.

Za prvé, lidský PTHrP, který je použit jako senzibilizující antigen pro vytváření protilátky, je připraven pomocí exprimování PTHrP genu/aminokyselinové sekvence popsané v Suva, L. J. a kol., Science (1987)237, 893. Nukleotidová sekvence kódující PTHrP je vložena do známého expresního vektoru, a s tímto expresním vektorem je transformována vhodná hostitelská buňka. PTHrP protein je potom z transformované hostitelské buňky nebo ze supernatantu buněčné kultury izolován a purifikován pomocí jakékoli známé metody.

Potom je purifikovaný PTHrP protein použit jako senzibilizující antigen. Jinou možností je, že jako senzibilizující antigen může být použit chemicky syntetizovaný peptid, skládající se z 34 aminokyselin, který tvoří N-koncovou oblast PTHrP.

Druh savce, který bude imunizován senzibilizujícím antigenem, není zvláště omezen. Avšak tento savec je s výhodou vybírán se zřetelem na slučitelnost s buňkami, které jsou použité pro buněčnou fúzi. Obecně může být použit hlodavec (například myš, krysa, křeček), králík nebo opice.

Imunizace savce senzibilizujícím antigenem může být provedena podle jakéhokoli známého postupu, například injekčním podáním senzibilizujícího antigenu savci intraperitoneálně nebo podkožně. Podrobněji řečeno, senzibilizující antigen je vhodně rozředěn nebo suspendován do fyziologického roztoku pufovaného fosforečnanem (PBS) nebo do fyziologického roztoku, výsledné ředění nebo suspenze je smíchána s vhodným množstvím běžného adjuvans (například Freudovo kompletní adjuvans), aby bylo dosaženo emulze. Emulze je savci podána injekčně několikrát v intervalech 4 až 21 dnů. Pro imunizaci může být senzibilizující antigen připojen ke vhodnému nosiči.

Po imunizaci je kontrolována hladina protilátky v séru. Když je potvrzeno, že hladina protilátky v séru dosáhla požadované úrovně, jsou ze savce izolovány imunocyty a je s nimi provedena buněčná fúze. Výhodným imunocytem je slezinná buňka.

Rodičovská buňka použitá pro buněčnou fúzi (tj. buňka sloužící jako protějšek při buněčné fúzi s imunocytem) je myelomová buňka odvozená ze savce. Myelomová buňka je z jakékoli známé buněčné linie, například P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. a Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. a kol., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. a kol., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. a kol., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) nebo R210 (Galfre, G. a kol., Nature (1979) 277, 131-133).

Buněčná fúze imunocytu s myelomovou buňkou je v podstatě provedena podle jakékoli známé metody, jako je například metoda podle Milstein a kol., (Kohler, G. a Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

Přesněji řečeno, buněčná fúze je provedena například ve vhodném živném médiu pro buněčné kultury, v přítomnosti činidla podporujícího buněčnou fúzi. Činidlo podporující buněčnou fúzi může být polyethylenglykol (PEG) nebo virus Sendai (hemaglutinující japonský virus; HVJ). Pokud je to žádoucí, za účelem vylepšení účinnosti fúze může být použito přísad, jako je dimethylsulfoxid.

Poměr mezi imunocyty a myelomovými buňkami při buněčné fúzi může být jakýkoli. Například imunocyty jsou použity v množství 1 až 10krát větším než buňky myelomové. Médium pro buněčné kultury, použité pro buněčnou fúzi, je například médium RPMI 1640 nebo médium MEM, vhodné pro růst výše uvedených myelomových buněčných linií, nebo jiné médium, běžně používané pro kultivaci takových buněčných linií. Pokud je to žádoucí, může být do kultivačního média přidán doplněk séra, jako je například fetální telecí sérum (FCS).

Buněčná fúze je provedena dokonalým promícháním daných množství imunocytů a myelomových buněk v kultivačním médiu, ke směsi je přidán roztok PEG (například s průměrnou molekulovou hmotností 1000 až 6000) (který byl předem ohřát na asi 37 °C) obvykle do 30 až 60% koncentrace (hmotnost/objem), a potom mícháním výsledného roztoku, čímž vznikají požadované fúzní buňky (tj. hybridomy). Poté je postupně ke kultivačnímu roztoku přidáno vhodné kultivační médium a je provedena centrifugace, aby byl odstraněn supernatant. Tento postup je několikrát opakován, aby bylo z kultivačního média odstraněno činidlo podporující buněčnou fúzi nebo jiné látky, které nejsou pro růst hybridomů žádoucí.

Získané hybridomy mohou být selektovány pěstováním v běžném selekčním médiu, jako je médium hypoxanthin-aminopterin-thymidin (HAT). Kultivování hybridomů v HAT médiu se provádí po časové období postačující k tomu, aby zahynuly všechny buňky kromě požadovaných hybridomů (tj. buňky které nefúzovaly), běžně se jedná o několik dní až několik týdnů. Poté je provedena běžná metoda koncového ředění, aby byly vybrány jednotlivé klony hybridomů, které vylučují požadovanou protilátku.

Jako jinou metodu, než je výše popsána metoda přípravy hybridomů pomocí imunizace savce, jiného než člověka, antigenem, je ta, kdy lidské lymfocyty mohou být senzitivovány PTHrP *in vitro* a potom je s těmito senzitivovanými lymfocyty provedena buněčná fúze s lidskými myelomovými buňkami, které jsou schopny nekonečného růstu, a tak je produkována lidská protilátka s vazebnou schopností k PTHrP (japonský patent 1-598 878). Jiným způsobem může být lidská protilátka proti PTHrP připravena



pomocí injekčního podání PTHrP jako antigenu transgennímu zvířeti, které má úplný repertoár lidských protilátkových genů, aby vytvořilo buňky produkující protilátku proti PTHrP, poté je provedena imortalizace těchto buněk, čímž je dosaženo produkování lidské protilátky v imortalizovaných buňkách (mezinárodní patenty WO 94/25 585, WO 93/12 227, WO 92/03 918 a WO 94/02 602).

Hybridomy produkující monoklonální protilátku, připravené jak bylo popsáno výše, mohou být pěstovány v běžném kultivačním médiu a uloženy v tekutém dusíku po dlouhé časové období.

Pro produkci monoklonální protilátky z hybridomu může být použita metoda, která sestává z kultivování hybridomu pomocí běžné techniky a odebírání monoklonální protilátky ze supernatantu buněčné kultury, nebo metoda, která sestává z injekčního podání hybridomu savci, který je s hybridomem slučitelný, aby došlo k růstu hybridomu v savci a monoklonální protilátka je odebírána z ascitů tohoto savce. První metoda je vhodná pro produkci protilátky o vysoké čistotě, zatímco druhá metoda je vhodná pro produkci protilátky ve vysokém množství.

### 3. Rekombinantní protilátka

V předloženém vynálezu může být použit rekombinantní typ protilátky, který může být vytvořen pomocí klonování protilátkového genu z hybridomu, vložením protilátkového genu do vhodného vektoru, vnesením vektoru do hostitele a potom produkováním protilátky z hostitele, vše pomocí běžné rekombinační genetické techniky (viz například Vandamme, A. M. a kol., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775).

Přesněji řečeno, mRNA kódující variabilní (V) oblast protilátky proti PTHrP je izolována z hybridomu produkujícího protilátku proti PTHrP. Izolace mRNA je provedena tak, že je pomocí jakékoli známé metody, jako je například ultracentrifugační metoda s guanidinem (Chirgwin, J. M. a kol., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) a AGPC metoda (Chomczynski, P. a kol., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) připravena celková RNA, a poté je z této celkové RNA získána požadovaná mRNA pomocí soupravy pro purifikaci mRNA (Pharmacia), nebo jiné podobné. Jinou možností je to, že mRNA může být také připravena přímo za použití soupravy QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

Dále je z mRNA pomocí reverzní transkriptázy syntetizována cDNA pro V oblast protilátky. Syntéza je prováděna pomocí soupravy AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Corporation) nebo pomocí jiné. cDNA může být

také syntetizována a amplifikována pomocí metody 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002; Belyavski, A. a kol., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) pomocí soupravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONETECH) v kombinaci s metodou PCR, nebo podobně.

Fragment DNA, o který se jedná, je izolován a purifikován z výsledného PCR produktu a poté je ligován do DNA vektoru, čímž je získán rekombinantní vektor. Rekombinantní vektor je vnesen do hostitele jako je *E. coli* a je vybrána kolonie obsahující požadovaný rekombinantní vektor. Nukleotidová sekvence DNA, o kterou se v rekombinantním vektoru jedná, je potvrzena pomocí například metodou ukončení řetězce pomocí dideoxynukleotidů.

Jakmile je jednou DNA kódující V oblast protilátky proti PTHrP získána, DNA je zabudována do expresního vektoru, který obsahuje DNA kódující konstantní (C) oblast požadované protilátky.

Pro produkování protilátky proti PTHrP, používané v předloženém vynálezu, je protilátkový gen zabudován do expresního vektoru tak, že protilátkový gen může být exprimován pod kontrolou oblastí kontrolujících expresi (například zesilovač transkripce, promotor). Hostitelská buňka je expresním vektorem transformována, aby exprimovala protilátky.

Při exprimování protilátkového genu mohou být DNA kódující těžký (H) řetězec a DNA kódující lehký (L) řetězec protilátky zabudovány do oddělených expresních vektorů, a potom je hostitelská buňka transformována současně výslednými rekombinantními expresními vektory. Jinou možností je, že obě DNA, DNA kódující H-řetězec a DNA kódující L-řetězec protilátky, mohou být sjednoceny společně do jednoho expresního vektoru, a potom může být hostitelská buňka transformována výsledným rekombinantním expresním vektorem (WO 94/11 523).

Pro produkci rekombinantní protilátky může být vedle výše zmíněných hostitelských buněk použito jako hostitel transgenní zvíře. Například protilátkový gen je vložen do předem určeného místa v genu, který kóduje protein přirozeně produkováný v mléce zvířete (např. kozí  $\beta$ -kasein), a je získán fúzní gen. Fragment DNA obsahující fúzní gen s protilátkovým genem je injekčně podáván kozímu embryu a toto je vneseno do kozí samice. Tyto kozí samice potom nosí transgenní kozu. Protilátka o kterou se jedná, je potom vylučována v mléce transgenní kozy nebo jejích potomků. Za účelem zvýšení produkce mléka u transgenní kozy, které obsahuje protilátku, může být této

transgenní koze podán vhodný hormon (Ebert, K. M. a kol., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

#### 4. Modifikovaná protilátka

Za účelem snížení reaktivity proti složkám lidského těla, může být v předloženém vynálezu použita uměle modifikovaná rekombinantní protilátka, jako je chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka. Modifikované protilátky mohou být připraveny pomocí následujících známých postupů.

Chimerní protilátka, která je použitelná v předloženém vynálezu, může být připravena ligací DNA kódující V oblast protilátky, připravenou jak bylo popsáno výše, s DNA kódující C oblast lidské protilátky, zabudováním produktu ligace do expresního vektoru a vnesením výsledného rekombinantního expresního vektoru do hostitele, aby produkoval chimerní protilátku.

Zušlechtěná protilátka je také označována jako „přetvořená lidská protilátka“, v níž jsou oblasti protilátky určující komplementaritu (CDR) z protilátky savce jiného než člověk (například myši) přeneseny na místo CDR lidské protilátky. Jsou také známy obecné genetické rekombinantní postupy pro přípravu takových zušlechtěných protilátek (EP 125 023; WO 96/02 576).

Přesněji řečeno, DNA sekvence do které jsou CDR z myši protilátky ligovány prostřednictvím podpurných oblastí (FR) lidské protilátky, je amplifikována PCR metodou za pomoci několika oligonukleotidů jako primerů, které byly navrženy tak, aby měly oblasti překrývající se s koncovými oblastmi CDR a FR. Získaná DNA je ligována do DNA kódující C oblast lidské protilátky a výsledný produkt ligace je zabudován do expresního vektoru. Získaný rekombinantní expresní vektor je vnesen do hostitele, který pak produkuje zušlechtěnou protilátku (EP 239 044, WO 96/02 576).

Oblasti FR lidské protilátky, ligované prostřednictvím CDR, jsou vybrány tak, že CDR mohou vytvořit vazebné místo pro vhodný antigen. Pokud je to nezbytné, aminokyselina (aminokyseliny) ve FR oblastech V oblasti protilátky mohou být zaměněny tak, že CDR přetvořené lidské protilátky mohou vytvořit vazebné místo pro vhodný antigen (Sato, K. a kol., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

C oblast chimerní nebo zušlechtěné protilátky může být jakákoli lidská C oblast, jako jsou Cy1, Cy2, Cy3, nebo Cy4, pro H řetězec a Ck nebo Cl pro L řetězec. C oblast lidské protilátky může být modifikována za účelem zabezpečení stabilní produkce protilátky.

Chimerní protilátka je složena z V oblastí odvozených z protilátky savce, jiného než je člověk, a z C oblastí odvozených z lidské protilátky. Zušlechtěná protilátka je vhodná jako aktivní složka terapeutického činidla, které je předmětem tohoto vynálezu, protože antigenicita protilátky proti lidskému tělu je snížena.

Specifickým příkladem zušlechtěné protilátky, vhodné pro předložený vynález, je zušlechtěná protilátka #23-57-137-1; v níž jsou CDR odvozeny z myší protilátky #23-57-137-1; L řetězec je složen z CDR ligovaných prostřednictvím tří FR (FR1, FR2 a FR3), odvozených z lidské protilátky HSU 03 368 (GEN-BANK, Deftos, M. a kol., Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) a FR (FR4), odvozené z lidské protilátky S 25 755 (NBRF-PDB); a H řetězec je složen z CDR ligovaných prostřednictvím FR, odvozených z lidské protilátky S 31 679 (NBRF-PDB, Cuisinier, A. a kol., Eur. J. Immunol. 23, 119-118, 1993), v níž je část aminokyselinových zbytků ve FR zaměněna tak, že přetvořená zušlechtěná protilátka může vykazovat vazebnou aktivitu pro antigen.

Kmeny *E. coli* obsahující plazmidy, které mají DNA kódující H řetězec popřípadě L řetězec zušlechtěné protilátky #23-57-137-1, jsou označeny *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) (pro H řetězec), popřípadě *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) (pro L řetězec). Tyto kmeny byly uloženy za podmínek budapešťské smlouvy 15. srpna 1996 v Národním ústavu biologických věd a lidské technologie, Agentura průmyslové vědy a technologie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod přístupovým číslem FERM BP-5629 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) a pod přístupovým číslem FERM BP-5630 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19).

## 5. Varianty protilátek

Protilátka použitá v předloženém vynálezu může být fragment protilátky nebo modifikovaná forma fragmentu, pokud je schopen se vázat k PTHrP a inhibovat aktivitu PTHrP. Například fragment protilátky zahrnuje Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv nebo jednořetězcový Fv (scFv), skládající se z Fv fragmentu H řetězce a Fv fragmentu L řetězce, spojených dohromady vhodným spojovníkem. Přesněji řečeno, takové fragmenty protilátek mohou být vytvořeny štěpením protilátky pomocí enzymu (například papain, pepsin) na protilátkové fragmenty, nebo zkonstruováním genu kódujícího fragment protilátky, vložením genu do expresního vektoru a vnesením výsledného expresního vektoru do vhodného hostitele, který pak fragment protilátky exprimuje (viz například Co, M. S. a

kol., J. Immunol. (1994), 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989), 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology (1989), 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989), 121, 652-663; Rousseaux, J. a kol., Methods in Enzymology (1989), 121, 663-669; a Bird, R. E. a kol., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

scFv může být vytvořen spojením V oblasti H řetězce s V oblastí L řetězce prostřednictvím spojovníku, s výhodou pomocí peptidového spojovníku (Huston, J. S. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). V oblast H řetězce a V oblast L řetězce v scFv může být odvozena z jakékoli zde popsané protilátky. Peptidový spojovník, který váže V oblasti, může být jakýkoli jednořetězcový peptid, dlouhý například 12 až 19 aminokyselinových zbytků.

DNA kódující scFv může být připravena napřed amplifikací DNA kódující V oblast H řetězce a DNA kódující V oblast L řetězce protilátky tak, že jsou jako matrice odděleně použity DNA fragment kódující celou oblast nebo část H řetězce, který obsahuje V oblast a DNA fragment kódující celou oblast nebo část L řetězce, který obsahuje V oblast, a páry primerů, které definují konce DNA fragmentů; a poté amplifikací DNA kódující peptidový spojovník, pomocí DNA fragmentu kódujícího peptidový spojovník jako matrice a páru primerů, které definují konce DNA fragmentu tak, že každý konec peptidového spojovníku je připojen k V oblasti H řetězce, popřípadě k V oblasti L řetězce.

Jakmile je jednou DNA kódující scFv připravena, může být pomocí běžných postupů připraven expresní vektor nesoucí tuto DNA a hostitel transformovaný tímto expresním vektorem. scFv může být produkován transformovaným hostitelem pomocí běžných postupů.

Fragmenty protilátky mohou být vytvořeny tak, že jsou připraveny geny pro tyto fragmenty a geny jsou exprimovány ve vhodných hostitelích, jak bylo popsáno výše. Fragmenty protilátky jsou také zahrnuty mezi „protilátky“ předloženého vynálezu.

Jako modifikované formy výše uvedených protilátek může také být použita například protilátka proti PTHrP, konjugovaná k nějaké molekule (například polyethylenglykolu). Takové modifikované protilátky jsou také zahrnuty mezi „protilátky“ předloženého vynálezu. Modifikované protilátky mohou být připraveny pomocí chemických modifikací protilátek. Postupy chemické modifikace, vhodné pro tento účel, byly již v oboru zavedeny.

## 6. Exprese a produkce rekombinantní protilátky nebo modifikované protilátky

Gen pro protilátku, zkonstruovaný jak bylo popsáno výše, může být vytvořen a exprimován pomocí známých postupů. Pro exprimování v savčí buňce jsou operativně spojeny běžný vhodný promotor, gen protilátky, který má být exprimován a signál pro poly(A) (umístěný po směru za 3' koncem genu pro protilátku). Například jako vhodný systém promotor/zesilovač transkripce může být použit systém z lidského cytomegaloviru bezprostředně časný promotor/zesilovač transkripce.

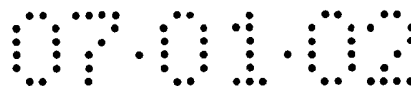
Jiné systémy promotor/zesilovač transkripce, vhodné pro expresi protilátky a použité v předloženém vynálezu, zahrnují ty systémy, které jsou odvozeny z virů (například retroviru, polyomaviru, adenoviru a opičího viru 40 (SV40)) a ty systémy, které jsou odvozeny ze savčích buněk (například lidský elongační fragment 1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ )).

Když je použit systém SV40 promotor/zesilovač transkripce, exprese genu může být provedena snadno pomocí postupu od Mulligan a kol., (Nature (1979) 277, 108). Když je použit systém HEF1 $\alpha$  promotor/zesilovač transkripce, exprese genu může být provedena snadno pomocí postupu od Mizushima a kol., (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

Pro expresi v *E. coli* mohou být operativně spojeny běžný vhodný promotor, signální sekvence pro vylučování protilátky o kterou se jedná, a gen protilátky. Jako promotor může být použity promotor lacZ nebo araB. Když je použit promotor lacZ, exprese genu může být provedena pomocí postupu od Ward a kol., (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427). Když je použit promotor araB, exprese genu může být provedena pomocí postupu od Better a kol., Science (1988) 240, 1041-1043).

Pokud se týká signální sekvence pro vylučování protilátky, když má být protilátka o kterou se jedná, vylučována do periplazmatického prostoru *E. coli*, může být použita signální sekvence pe1B (Lei, S. P. a kol., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379). Protilátka vylučovaná do periplazmatického prostoru je izolována a poté znovu prostorově uspořádána tak, že protilátka získá konfiguraci vhodnou pro použití.

Pokud se týká počátku replikace, mohou být použity počátky replikace odvozené z virů (například SV40, polyomaviru, adenoviru, hovězího papilomaviru (BPV)) nebo podobné. Aby se zvýšil počet kopií genu v hostitelském buněčném systému, může dále expresní vektor obsahovat selektovatelný značící gen, jako je například gen pro



aminoglykosidfosforibosyltransferázu (APH), gen pro thymidinkinázu (TK), gen pro xanthin-guanidinfosforibosyltransferázu *E. coli* (Ecogpt) a gen pro dihydrofolát-reduktázu (dhfr).

Pro produkci protilátky použité v předloženém vynálezu, může být použit jakýkoli expresní systém, jako jsou eukaryotické a prokaryotické expresní systémy. Eukaryotické buňky zahrnují zavedené živočišné buněčné linie (například ze savců, hmyzu, plísní a hub, kvasinek). Prokaryotické buňky zahrnují bakteriální buňky, jako jsou buňky *E. coli*.

Je výhodné, když je protilátka používaná v předloženém vynálezu exprimována v savčí buňce, jako je buňka CHO, COS, myeloma, BHK, Vero nebo HeLa.

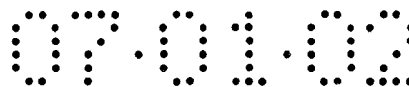
Dále je transformovaná hostitelská buňka kultivována *in vitro* nebo *in vivo*, aby produkovala protilátky, o které se jedná. Kultivace hostitelských buněk může být provedena pomocí jakéhokoli známého postupu. Zde může být použitelné kultivační médium DMEM, MEM, RPMI 1640 nebo IMDM. Kultivační médium může obsahovat doplněk séra, jako je fetální telecí sérum (FCS).

#### 7. Izolace a purifikace protilátky

Protilátka exprimovaná a produkována tak, jak bylo popsáno výše, může být izolována z buněk nebo z těla hostitelského živočicha, a vyčištěna do homogenity. Izolace a purifikace protilátky, používané v předloženém vynálezu, může být provedena na afinitním sloupci. Příklady sloupců s proteinem A zahrnují sloupce Hyper D, POROS a Sepharose F.F. (Pharmacia). Postup není žádným zvláštním způsobem omezen a mohou být použity i jiné postupy, které jsou běžně používány pro izolaci a purifikaci protilátky. Například mohou být použity rozmanité chromatografické postupy, které používají jiné sloupce než jsou výše zmíněné afinitní sloupce, používají filtraci, ultrafiltraci, vysolování a dialýzu, buď samotné nebo v kombinaci, pro izolaci a vyčištění protilátky, o kterou se jedná (Protilátky: Laboratorní příručka. vyd. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

#### 8. Určování aktivit protilátky

Určování vazebné aktivity k antigenu (Protilátky: Laboratorní příručka. vyd. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) nebo inhibiční aktivity proti ligandu receptoru (Harada, A. a kol., *International Immunology* (1993) 5, 681-690) u protilátky používané v předloženém vynálezu, může být provedeno pomocí jakýchkoli známých postupů. Postupy pro určení vazebné aktivity k antigenu protilátky proti



PTHrP, používané v předloženém vynálezu, mohou být test ELISA (imunoabsorbční test s vázaným enzymem), EIA (enzymový imunologický test), RIA (radioimunotest) nebo fluorescenční protilátka. Například když je prováděn enzymový imunologický test, roztok vzorku, obsahující protilátku proti PTHrP (například supernatant z kultury buněk produkujících protilátku proti PTHrP nebo protilátku proti PTHrP v čištěné formě), je přidán na destičku, která byla předem potažena PTHrP (1-34). Dále je na destičku přidána sekundární protilátka, označená enzymem (například alkalickou fosfatázou). Destička je inkubována a promyta. K destičce je přidán substrát pro enzym (například kyselina p-nitrofenylfosforečná) a je měřena absorbance roztoku, aby byla zhodnocena vazebná aktivita protilátky k antigenu.

Pro potvrzení aktivity protilátky použité v předloženém vynálezu, může být stanovena neutralizační aktivita protilátky (například u protilátky proti PTHrP).

#### 9. Způsoby podávání a farmaceutické přípravky

Terapeutické činidlo předloženého vynálezu může být použito pro léčení nebo zlepšení hyperkalcinémie, která je odolná k lékům. Hyperkalcinémie, která je odolná k lékům, může být typ indukovaný rakovinou nebo typ jiný. Příkladem hyperkalcinémie indukované rakovinou je hyperkalcinémie indukovaná zhoubným bujením.

Příklady hyperkalcinémie, které nejsou indukované rakovinou, zahrnují perinatální hyperkalcinémii u gravidních a kojících žen a novorozeneckou hyperkalcinémii.

Terapeutické činidlo, obsahující jako svou aktivní složku protilátku proti PTHrP, která je předmětem předloženého vynálezu, může být podáváno orálně nebo parenterálně, s výhodou parenterálně. Terapeutické činidlo může být v jakékoli dávkové formě, jako je činidlo podávané plícemi (například činidlo podávané s pomocí takového zařízení jako je rozprašovač), nazogastriční činidlo, kožní činidlo (mast, krém) nebo injekce. Příklady injekcí zahrnují nitrožilní injekci (například kapky), nitrosvalovou injekci, intraperitoneální injekci a podkožní injekci pro systémové nebo místní podávání. Způsob podávání může být vhodně vybrán v závislosti na věku pacienta a stavu choroby. Účinná jednotlivá dávka může být vybrána v rozsahu od 0,001 do 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti, s výhodou 0,1 až 50 mg na kg tělesné hmotnosti, ještě výhodněji 0,5 až 10 mg na kg tělesné hmotnosti. Jiná možnost je, že dávka pro pacienta může být vybrána v rozsahu od 0,01 do 100 000 mg/osobu, s výhodou 1 až 5000 mg/osobu, ještě výhodněji 10 až 500 mg/osobu. Avšak dávka

terapeutického činidla, obsahující protilátku proti PTHrP, která je předmětem tohoto vynálezu, není příliš na tyto rozsahy omezena.

Terapeutické činidlo může být podáno pacientovi v jakémkoli stavu, včetně před nebo po vývoji hyperkalcinémie, odolné proti lékům. Terapeutické činidlo může být také podáno ve stavu, kdy je u pacienta předpovídána ztráta tělesné hmotnosti.

Terapeutické činidlo obsahující jako svou aktivní složku protilátku proti PTHrP může být sestaveno jakýmkoli běžným postupem (Remington's Pharmaceutical Science, poslední vydání, Mark Publishing Company, Easton, USA). Přípravek může dále obsahovat farmaceuticky přijatelné nosiče a přísady.

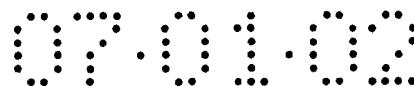
Příklady takových nosičů a přísad zahrnují vodu, farmaceuticky přijatelná organická rozpouštědla, kolagen, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, karboxyvinylový polymer, sodnou sůl karboxymethylcelulózy, polymer akrylátu sodného, sodnou sůl kyseliny arginové, ve vodě rozpustný dextran, sodnou sůl karboxymethylového derivátu škrobu, pektin, methylcelulózu, ethylcelulózu, xanthanovou gumu, arabskou gumu, kasein, agar, polyethylenglykol, diglycerin, glycerin, propylenglykol, vazelínu, parafín, stearylalkohol, kyselinu stearová, lidský sérumalbumin (HSA), manit, sorbit, laktózu a povrchově aktivní činidla, přijatelná jako farmaceutické přísady.

Při praktickém použití je přísada vhodně vybrána z výše uvedených členů buď samostatně nebo v kombinaci, která závisí na (bez omezení) použité dávkové formě. Například pro použití ve formě podávané pomocí injekce, je protilátka proti PTHrP v čisté formě rozpuštěna v rozpouštědle (například fyziologický roztok, pufr, roztok hroznového cukru) a potom je k tomu přidáno činidlo zabraňující adsorbci (například Tween 80, Tween 20, želatina, lidský sérumalbumin). Terapeutické činidlo, které je předmětem tohoto vynálezu, může také být v lyofilizované formě, která se před použitím rozpustí. Pro přípravu lyofilizované dávkové formy mohou být použity excipienty, jako je cukerný alkohol (například manit, hroznový cukr).

#### Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 je graf znázorňující výsledky farmakologické studie na zvířecím modelu hyperkalcinémie, která je odolná k bifosfonátu.

Obrázek 2 je graf znázorňující výsledky farmakologické studie na zvířecím modelu hyperkalcinémie, která je odolná k bifosfonátu.



Obrázek 3 je graf znázorňující výsledky farmakologické studie na zvířecím modelu hyperkalcinémie, která je odolná k kalcitoninu.

Obrázek 4 je graf znázorňující výsledky farmakologické studie na zvířecím modelu hyperkalcinémie, která je odolná k kalcitoninu.

### Příklady provedení vynálezu

Dále zde bude předložený vynález popsán do větších detailů s odkazem na následující referenční příklady a příklady, které by neměly být chápány jako omezující pro technický rozsah vynálezu.

Příklad 1: Farmakologická studie na zvířecím modelu hyperkalcinémie odolné k bifosfonátu

#### (1) Cíl studie

Vytvořit zvířecí model hyperkalcinémie odolné k bifosfonátu pomocí zvířecího modelu hyperkalcinémie (nahá krysa s implantovaným lidským nádorem) a vyzkoušet terapeutický účinek zušlechtěné monoklonální protilátky proti PTHrP na úroveň vápníku v krvi u modelového zvířete.

#### (2) Metody

Jako zvířecí model byla použita nahá krysa s implantovaným lidským plicním karcinomem velkých buněk LC-6 [zakoupena v Centrálním ústavu pro pokusná zvířata]. Je známo, že nahá krysa s implantovaným lidským plicním karcinomem velkých buněk LC-6 vykazuje současně se zvětšujícím se objemem nádoru zvýšenou hladinu vápníku v krvi a nastává u ní ztráta tělesné hmotnosti atd. Poté, co byla hyperkalcinémie potvrzena, byl zvířecímu modelu opakovaně podáván alendronat, což je druh bifosfonátu, dokud nedošlo k tomu, že v krvi nebylo pozorováno žádné vylepšení hladiny vápníku v krvi, jinými slovy, dokud zvířecí model nezískal rezistenci k bifosfonátu. Tímto způsobem byl vytvořen zvířecí model hyperkalcinémie odolné k bifosfonátu. Lidský plicní karcinom velkých buněk LC-6 byl kultivován *in vivo* na nahých myších BALB/c-nu/nu (CLEA Japonsko, Inc.).

Příznivý účinek zušlechtěné monoklonální protilátky u krysího modelu hyperkalcinémie, která je odolná k bifosfonátu byl hodnocen s ohledem na tělesnou hmotnost a úroveň krevního vápníku v krvi krysy.

Pro zhodnocení farmakologických účinků zušlechtěné monoklonální protilátky byly zakoupeni 5 týdnů staří samci nahých krys F344/N Jcl-rnu (CLEA Japan, Inc.) a aklimatizováni jeden týden. Poté byl těmto 6 týdnů starým krysám implantován nádor, a krysy se zvýšenou hladinou vápníku v krvi a se sníženou tělesnou hmotností byly použity jako zvířecí model hyperkalcinémie. Byly připraveny zvířecí modely hyperkalcinémie odolné k bifosfonátu a následujícím způsobem byly rozděleny do skupin. Kultivovaný lidský plicní karcinom velkých buněk LC-6 byl odebrán z nahé myši a potom jemně nařezán na kostičky o hraně 3 mm. Získané nádorové bločky byly implantovány každé kryse pod kůži na bocích v poměru 1 bloček na myš. Asi jeden a půl měsíce po implantaci byly krysy se zvýšenými hladinami vápníku v krvi a se sníženou tělesnou hmotností (tj. zvířecí model hyperkalcinémie) rozděleny do skupin tak, že hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti krys v jednotlivých skupinách byly zprůměrovány.

Alendronat ve formě známého farmaceutického preparátu pro hyperkalcinémii (injekce sodné soli hydrátu alendronatu, „Teiroc Injection“ od Teijin Limited) byl podáván každé skupině zvířecích modelů hyperkalcinémie ocasní žílou dvakrát týdně v dávkách 2,5 mg/kg. Jako kontrola byl podáván fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) každému zvířeti v jiné skupině zvířecích modelů hyperkalcinémie ocasní žílou dvakrát týdně. Ve skupině zvířecích modelů, kterým byl podáván alendronat, byla ta zvířata, u kterých se neprojevovalo žádné zlepšení krevní hladiny vápníku po pěti podáních alendronatu (tj. podán ve dnech 0, 3, 7, 10 a 14), rozpoznána jako zvířecí modely hyperkalcinémie, odolné k bifosfonátu. V 17. den byla takto rozpoznaná modelová zvířata rozdělena do skupin tak, že hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti krys v jednotlivých skupinách byly zprůměrovány.

Zkoušení terapeutického účinku na hyperkalcinémii, odolnou k bifosfonátu, bylo provedeno následujícím způsobem. V testované skupině zvířecích modelů hyperkalcinémie, odolné k bifosfonátu (které byly vytvořeny a rozděleny do skupin jak bylo uvedeno výše), bylo podáváno každému zvířecímu modelu do ocasní žíly buď 3 mg/kg zušlechtěné monoklonální protilátky proti PTHrP nebo 2,5 mg/kg alendronatu. V kontrolní skupině byl každému zvířecímu modelu podáván do ocasní žíly PBS.

Určování hladin vápníku v krvi a tělesné hmotnosti bylo prováděno 3., 7., 10., 14. a 17. den po podání buď alendronatu nebo PBS. Modelová zvířata ze skupiny, které byl podáván alendronat, byla 17. den rozdělena do skupin tak, že hladiny vápníku

v krvi a tělesné hmotnosti krysy v jednotlivých skupinách byly zprůměrovány. V každé z testovaných skupin byla podávána buď zušlechtěná monoklonální protilátka nebo alendronat. V kontrolní skupině byl podáván PBS. Čtvrtý a sedmý den po podání zušlechtěné monoklonální protilátky nebo alendronatu, byla u každého zvířete měřena hladina vápníku v krvi a tělesná hmotnost, aby byla určena farmakologická účinnost.

Hladina vápníku v krvi byla určována jako celkové množství ionizovaného vápníku v krvi tak, že každému zvířeti byla z ocasní žíly odebrána krev pomocí hematokritové zkumavky a k měření byl použit automatický analyzátor Ca/pH, model 643 (CIBA-CORNING).

### (3) Výsledky

Zvířecí modely hyperkalcémie odolné k bifosfonátu byly úspěšně vytvořeny tím, že byl bifosfonát podáván opakovaně celkem pětkrát, přičemž intervaly byly dvakrát týdně. Zušlechtěná monoklonální protilátka, která je předmětem tohoto vynálezu, může zlepšit hladinu vápníku v krvi u zvířecího modelu hyperkalcémie odolné k bifosfonátu (Obr. 1). U skupiny zvířat, kterým byla podávána protilátka bylo také pozorováno obnovení tělesné hmotnosti (Obr. 2). Z těchto výsledků bylo uzavřeno, že zušlechtěná monoklonální protilátka proti PTHrP je užitečná jako terapeutické činidlo pro hyperkalcémii způsobenou zhoubným bujením, která získala odolnost k bifosfonátu.

Příklad 2: Farmakologický test na zvířecím modelu hyperkalcémie odolné ke kalcitoninu

#### (1) Cíl studie

Vytvořit zvířecí model hyperkalcémie odolné ke kalcitoninu pomocí zvířecího modelu hyperkalcémie (nahá krysa s implantovaným lidským nádorem) a vyzkoušet terapeutický účinek zušlechtěné monoklonální protilátky proti PTHrP na úroveň vápníku v krvi u modelového zvířete.

#### (2) Metody

Jako zvířecí model byla použita nahá krysa s implantovaným lidským plicním karcinomem velkých buněk LC-6 [zakoupena v Centrálním ústavu pro pokusná zvířata]. Je známo, že nahá krysa s implantovaným lidským plicním karcinomem velkých buněk LC-6 vykazuje současně se zvětšujícím se objemem nádoru zvýšenou hladinu vápníku v krvi a nastává u ní ztráta tělesné hmotnosti atd. Poté, co byla hyperkalcémie

potvrzena, byl zvířecímu modelu opakovaně podáván elcatonin, což je druh kalcitoninu, dokud nedošlo k tomu, že v krvi nebylo pozorováno žádné vylepšení hladiny vápníku v krvi, jinými slovy, dokud zvířecí model nezískal rezistenci ke kalcitoninu. Tímto způsobem byl vytvořen zvířecí model hyperkalcinémie odolné ke kalcitoninu. Lidský plicní karcinom velkých buněk LC-6 byl kultivován *in vivo* na nahých myších BALB/c-nu/nu (CLEA Japonsko, Inc.).

Příznivý účinek zušlechtěné monoklonální protilátky u krysího modelu hyperkalcinémie, která je odolná ke kalcitoninu, byl hodnocen s ohledem na tělesnou hmotnost a úroveň krevního vápníku v krvi krys.

Pro zhodnocení farmakologických účinků zušlechtěné monoklonální protilátky byly zakoupeni 5 týdnů staří samci nahých krys F344/N Jcl-rnu (CLEA Japan, Inc.) a aklimatizováni jeden týden. Poté byl těmto 6 týdnů starým krysám implantován nádor, a krysy se zvýšenou hladinou vápníku v krvi a se sníženou tělesnou hmotností byly použity jako zvířecí model hyperkalcinémie. Byly připraveny zvířecí modely hyperkalcinémie odolné ke kalcitoninu a následujícím způsobem byly rozděleny do skupin. Kultivovaný lidský plicní karcinom velkých buněk LC-6 byl odebrán z nahé myši a potom jemně nařezán na kostičky o hraně 3 mm. Získané nádorové bločky byly implantovány každé kryse pod kůži na bocích v poměru 1 bloček na myš. Asi jeden a půl měsíce po implantaci byly krysy se zvýšenými hladinami vápníku v krvi a se sníženou tělesnou hmotností (tj. zvířecí model hyperkalcinémie) rozděleny do skupin tak, že hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti krys v jednotlivých skupinách byly zprůměrovány.

Elcatonin („Elcitonin Injection“ od Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) byl podáván každé skupině zvířecích modelů hyperkalcinémie ocasní žílou dvakrát denně v dávce 10 j/kg (v intervalech 12 hodin). Jako kontrola byl podáván PBS každému zvířeti v jiné skupině zvířecích modelů hyperkalcinémie ocasní žílou dvakrát týdně. Ve skupině zvířecích modelů, kterým byl podáván elcatonin, byla ta zvířata, u kterých se neprojevovalo žádné zlepšení krevní hladiny vápníku po dvanácti podáních elcatoninu (tj. podání ve dnech 0, 1, 2, 3, 4 a 5 dvakrát denně), rozpoznána jako zvířecí modely hyperkalcinémie, odolné k elcatoninu. Tato rozpoznaná modelová zvířata byla rozdělena do skupin tak, že hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti krys v jednotlivých skupinách byly zprůměrovány.

Zkoušení terapeutického účinku na hyperkalcinémii, odolnou k elcatoninu, bylo provedeno následujícím způsobem. V testované skupině zvířecích modelů hyperkalcinémie, odolné k elcatoninu (které byly vytvořeny a rozděleny do skupin jak bylo uvedeno výše), byla podávána každému zvířecímu modelu do ocasní žíly buď zušlechtěná monoklonální protilátka proti PTHrP (3 mg/kg) nebo PBS. V kontrolní skupině byl každému zvířecímu modelu podáván do ocasní žíly PBS.

Určování hladin vápníku v krvi bylo prováděno ve dnech 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 a 6 po podání buď elcatoninu nebo PBS. Zjišťování tělesné hmotnosti bylo prováděno ve dnech 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 a 6 po podání buď elcatoninu nebo PBS. Modelová zvířata ze skupiny, které byl podáván elcatonin, byla 6. den rozdělena do skupin tak, že hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti krys v jednotlivých skupinách byly zprůměrovány. V každé z testovaných skupin byla podávána buď zušlechtěná monoklonální protilátka nebo PBS. V kontrolní skupině byl podáván PBS. První a třetí den po podání zušlechtěné monoklonální protilátky nebo PBS, byla u každého zvířete měřena hladina vápníku v krvi a tělesná hmotnost, aby byla určena farmakologická účinnost.

Hladina vápníku v krvi byla určována jako celkové množství ionizovaného vápníku v krvi tak, že každému zvířeti byla z ocasní žíly odebrána krev pomocí hematokritové zkumavky a k měření byl použit automatický analyzátor Ca/pH, model 643 (CIBA-CORNING).

### (3) Výsledky

Zvířecí modely hyperkalcinémie odolné ke kalcitoninu byly úspěšně vytvořeny tím, že byl kalcitonin podáván opakovaně celkem dvanáctkrát v intervalech dvakrát za den. Zušlechtěná monoklonální protilátka úspěšně zlepšila hladinu vápníku v krvi u zvířecího modelu hyperkalcinémie odolné ke kalcitoninu (Obr. 3). U skupiny zvířat, kterým byla podávána protilátka bylo také pozorováno obnovení tělesné hmotnosti (Obr. 4). Z těchto výsledků bylo uzavřeno, že zušlechtěná monoklonální protilátka proti PTHrP je užitečná jako terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii způsobenou zhoubným bujením, která získala odolnost ke kalcitoninu.

Referenční příklad 1: Příprava hybridomů produkujících myší monoklonální protilátku (1-34) proti PTHrP.

Hybridomy schopné produkovat monoklonální protilátku proti lidskému PTHrP (1-34) (SEQ ID NO: 75), #23-57-154 a #23-57-137-1 byly připraveny následujícím způsobem (viz SATO, K. a kol., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993). Aminokyselinová sekvence lidského PTHrP (1-34) je uvedena v SEQ ID NO: 75.

Pro použití jako imunogen byl PTHrP (1-34) (Peninsula) pomocí karbodiimidu (Dojinn) konjugován s proteinem thyroglobulinem jako nosičem. PTHrP (1-34) konjugovaný s thyroglobulinem byl dialyzován, aby byl získán roztok s koncentrací proteinu 2 µg/ml. Výsledný roztok byl smíchán s Freudovým adjuvans (Difco) v poměru 1:1 aby byla získána emulze. Tato emulze byla injekčně jedenáctkrát podána podkožně 16 samicím myšího kmene BALB/C, na zádech nebo intraperitoneálně, v dávce 100 µg/myš v každé injekci, čímž byly myši imunizovány. Pro započítání imunizace bylo použito kompletní Freudovo adjuvans; zatímco pro posilovací imunizaci bylo použito nekompletní Freudovo adjuvans.

U každé imunizované myši byl zjišťován její titr protilátek v séru následujícím způsobem. Každé myši byla odebrána krev z ocasní žíly a od krve bylo odděleno antisérum. Antisérum bylo zředěno RIA puřem a pro určení vazebné aktivity bylo smícháno s PTHrP (1-34) značeným <sup>125</sup>I. Myším, u kterých bylo potvrzeno že mají dostatečně zvýšený titr, byl pro závěrečnou imunizaci podán injekčně intraperitoneálně PTHrP (1-34) bez proteinového nosiče, v dávce 50 µg/myš.

Tři dny po závěrečné imunizaci byly myši usmrceny a byla z nich odebrána slezina. Se slezinnými buňkami byla provedena buněčná fúze s myší myelomovou buněčnou linií P3x63Ag8U.1 podle obecně známého postupu za použití 50% polyethylenglykolu 4000. Takto připravené fúzované buňky byly vysety do destiček s 96 jamkami v hustotě 2x10<sup>4</sup>/jamku. Hybridomy byly tříděny v médiu HAT následujícím způsobem.

Třídění hybridomů bylo provedeno pomocí testu RIA na pevné fázi, zjišťováním přítomnosti protilátek rozpoznávajících PTHrP v supernatantu buněčných kultur v jamkách, ve kterých byl pozorován růst buněk v médiu HAT. Hybridomy byly sbírány z jamek, ve kterých byla potvrzena vazebná schopnost protilátek rozpoznávajících PTHrP. Takto získané hybridomy byly suspendovány v médiu RPMI-1640 obsahujícím 15 % FCS doplněné doplňkem OPI (Sigma), a následovala unifikace hybridomů pomocí metody koncového ředění. Tak byly získány dva typy hybridomových klonů, #23-57-154 a #23-57-137-1, kdy oba vykazují vysokou schopnost vazby k PTHrP (1-34).

Hybridomový klon #23-57-137-1 byl označen (hybridom myš-myš #23-57-137-1) a uložen za podmínek budapeštské smlouvy 15. srpna 1996 v Národním ústavu biologických věd a lidské technologie, Agentura průmyslové vědy a technologie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod přístupovým číslem FERM BP-5631.

Referenční příklad 2: Klonování DNA kódujících V oblasti myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP (1-34).

Klonování DNA kódujících V oblasti myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP (1-34), #23-57-137-1, bylo provedeno následujícím způsobem.

(1) Příprava mRNA

mRNA z hybridomu #23-57-137-1 byla připravena pomocí soupravy Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech). Tedy buňky hybridomu #23-57-137-1 byly zcela homogenizovány s extrakčním pufrém a mRNA byla z něho izolována a vyčištěna na centrifugačních sloupcích s oligo-dT celulózou podle návodu přibaleného k soupravě. U výsledného roztoku bylo provedeno srážení alkoholem, aby byla mRNA získána ve formě sraženiny. Sraženina mRNA byla rozpuštěna v elučním pufru.

(2) Příprava a amplifikace cDNA genu kódujícího V oblast myšího H řetězce

(i) Klonování cDNA pro V oblast H řetězce protilátky #23-57-137-1

Gen kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP byl klonován pomocí metody 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. a kol., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989). Metoda 5'-RACE byla provedena pomocí soupravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONTECH), podle návodu přibaleného k soupravě. Při tomto postupu byl jako primer pro syntézu cDNA použit primer MHC2 (SEQ ID NO: 1), který je schopen hybridizovat k C oblasti myšího H řetězce. mRNA připravená jak bylo popsáno výše, (asi 2 µg), která byla matricí pro syntézu cDNA, byla smíchána s primerem MHC2 (10 pmol). Výsledná směs reagovala s reverzní transkriptázou při teplotě 52 °C po dobu 30 minut, aby se uskutečnila reverzní transkripce mRNA na cDNA.

K výslednému reakčnímu roztoku byl přidán 6 N NaOH, aby byla hydrolyzována veškerá v něm zbývající RNA (65 °C po dobu 30 minut) a potom bylo provedeno srážení alkoholem, aby byla cDNA izolována a vyčištěna ve formě sraženiny. Vyčištěná cDNA byla na 5'konci ligována k Ampli FINDER Anchor (SEQ ID NO: 42) reakcí s T4



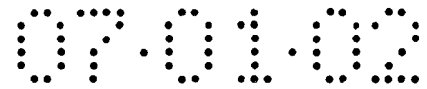
RNA ligázou při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin a dále při teplotě místnosti po dobu 16 hodin. Jako primery pro amplifikaci cDNA metodou PCR byly použity Anchor primer (SEQ ID NO: 2) a primer MHC-G1 (SEQ ID NO: 3) (S. T. Jones, a kol., *Biotechnology*, 9, 88, 1991).

Roztok PCR obsahoval (na 50 µl) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 jednotky TaKaRa Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), 10 pmol Anchor primeru a 1 µl reakční směsi cDNA, k níž byly ligovány MHC-G1 primer a Ampli FINDER Anchor primer, a přes to byl navrstven minerální olej (50 µl). PCR byla provedena na termocykleru model 480J (Perkin Elmer) v 30 cyklech za podmínek: 94 °C po dobu 45 sekund; 60 °C dobu 45 sekund; a 72 °C po dobu 2 minut.

(ii) Klonování cDNA pro V oblast L řetězce protilátky #23-57-137-1

Gen kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP byl klonován pomocí metody 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. a kol., *Nucleic Acids Res.* 17, 2919-2932, 1989). Metoda 5'-RACE byla provedena pomocí soupravy 5'-Ampli FINDER RACE Kit (CLONTECH) podle návodu přibaleného k soupravě. Při tomto postupu byl jako primer pro syntézu cDNA použit primer oligo-dT. mRNA připravená jak bylo popsáno výše, (asi 2 µg), která byla matricí pro syntézu cDNA, byla smíchána s oligo-dT primerem. Výsledná směs reagovala s reverzní transkriptázou při teplotě 52 °C po dobu 30 minut, aby se uskutečnila reverzní transkripce mRNA na cDNA. K výslednému reakčnímu roztoku byl přidán 6 N NaOH, aby byla hydrolyzována veškerá v něm zbývající RNA (65 °C po dobu 30 minut). Výsledný roztok byl srážen alkoholem, aby byla cDNA izolována a vyčištěna ve formě sraženiny. Takto syntetizovaná cDNA byla na 5'konci ligována k Ampli FINDER Anchor reakcí s T4 RNA ligázou při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin a dále při teplotě místnosti po dobu 16 hodin.

PCR primer MLC (SEQ ID NO: 4) byl navržen na základě konzervované sekvence C oblasti myšího L řetězce  $\lambda$  a potom syntetizován pomocí DNA/RNA syntezátoru model 394 (ABI). Roztok PCR obsahoval (na 100 µl) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 jednotky AmpliTaq (PERKIN ELMER), 50 pmol Anchor primeru (SEQ ID NO: 2) a 1 µl reakční směsi cDNA, k níž byly ligovány MLC (SEQ ID NO: 4) a Ampli FINDER Anchor, a přes to byl navrstven minerální olej (50 µl). PCR byla provedena na termocykleru



model 480J (Perkin Elmer) v 35 cyklech za podmínek: 94 °C po dobu 45 sekund; 60 °C po dobu 45 sekund; a 72 °C po dobu 2 minut.

(iii) Čištění a fragmentace produktů PCR

Každý z DNA fragmentů amplifikovaných metodou PCR, jak bylo popsáno výše, byl oddělen pomocí agarózové gelové elektroforézy na gelu 3% Nu Sieve GTG agarósy (FMC Bio. Products). Jak pro V oblast H řetězce tak pro V oblast L řetězce byl z gelu vyříznut segment agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA dlouhý asi 550 párů bází. U každého segmentu gelu byla provedena purifikace fragmentu DNA, o který se jedná, pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Vyčištěná DNA byla sražena ethanolem a sraženina DNA byla rozpuštěna v 20 µl roztoku, který obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Vzorek (1µl) roztoku DNA byl štěpen restriční enzymem XmaI (New England Biolabs) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny a dále štěpen restriční enzymem EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpený roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a poté srážen ethanolem, aby byla DNA získána.

Tímto způsobem byly získány dva fragmenty DNA obsahující gen kódující V oblast myšího H řetězce, respektive V oblast myšího L řetězce, přičemž oba měly rozpoznávací sekvenci pro EcoRI na 5' konci a rozpoznávací sekvenci pro XmaI na 3' konci.

EcoRI-XmaI DNA fragmenty obsahující gen kódující V oblast myšího H řetězce, respektive gen kódující V oblast myšího L řetězce, byly odděleně ligovány do vektoru pUC19, který byl štěpen EcoRI a XmaI při teplotě 16 °C po dobu 1 hodiny, za použití DNA ligační soupravy verze 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) podle návodu přibaleného k soupravě. Část (10 µl) ligační směsi byla přidána ke 100 µl roztoku obsahujícího kompetentní buňky E. coli JM 109 (Nippon Gene Co., Ltd.). Buněčná směs byla ponechána stát na ledu po dobu 15 minut, potom při teplotě 42 °C 1 minutu a dále 1 minutu na ledu. K výsledné buněčné směsi bylo přidáno 300 µl média SOC (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a potom byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Výsledný roztok buněk byl vyset na agarové médium LB nebo na 2xYT agarové médium (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), obsahující buď 100 nebo 50 µg/ml ampicilinu, 0,1 mM IPTG a 20 µg/ml X-gal, a

potom inkubovány při teplotě 37 °C noc. Tímto způsobem byly připraveny transformované buňky *E. coli*.

Transformované buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C noc ve 2 ml média LB nebo 2xYT, které obsahovalo buď 100 nebo 50 µg/ml ampicilinu. Frakce buněk byla zpracována v extraktoru plazmidů PI-100 (Kurabo Industries, Ltd.) nebo pomocí QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN), aby byla získána plazmidová DNA. Plazmidová DNA byla sekvenována následujícím způsobem:

#### (4) Sekvenování genů kódujících V oblasti myší protilátky

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti nesené na plazmidu byla určena na DNA sekvenátoru 373A (ABI; Perkin-Elmer) pomocí sekvenační soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Jako primery pro sekvenování byly použity M13 primer M4 (Takara Shuzo Co., Ltd.) (SEQ ID NO: 5) a M13 primer RV (Takara Shuzo Co., Ltd.) (SEQ ID NO: 6), a nukleotidová sekvence byla potvrzena v obou směrech.

Plazmid obsahující gen kódující V oblast myšího H řetězce, odvozený z hybridomu #23-57-137-1 byl označen „MBC1H04“ a plazmid obsahující gen kódující V oblast myšího L řetězce, odvozený z hybridomu #23-57-137-1 byl označen „MBC1L24“. Nukleotidové sekvence (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) genu kódujícího V oblast H řetězce, odvozenou z myší protilátky #23-57-137-1 v plazmidu MBC1H04 a genu kódujícího V oblast L řetězce, odvozenou z myší protilátky #23-57-137-1 v plazmidu MBC1L24 byly uvedeny v SEQ ID NO: 57, respektive SEQ ID NO: 65. Aminokyselinové sekvence polypeptidů pro V oblast H řetězce a V oblast L řetězce byly uvedeny v SEQ ID NO: 46, respektive SEQ ID NO: 45.

Kmen *E. coli* obsahující plazmid MBC1H04 a kmen *E. coli* obsahující plazmid MBC1L24 byly označeny „*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04)“, respektive „*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24)“. Tyto kmény *E. coli* byly uloženy za podmínek budapeštské smlouvy v Národním ústavu biologických věd a lidské technologie, Agentura průmyslové vědy a technologie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko) 15. srpna 1996 pod přístupovým číslem FERM BP-5628 pro *Escherichia coli* JM109 (MBC1H04), respektive FERM BP-5627 pro *Escherichia coli* JM109 (MBC1L24).

#### (5) Stanovení CDR myší monoklonální protilátky

## #23-57-137-1 proti lidskému PTHrP

V oblast H řetězce a V oblast L řetězce byly vzájemně podobné obecné struktury, z nichž každá má čtyři podpůrné oblasti (FR) spojené třemi hypervariabilními oblastmi (tj. oblastmi určujícími komplementaritu; CDR). Aminokyselinové sekvence FR jsou relativně dosti konzervované, zatímco aminokyselinové sekvence CDR mají extrémně vysokou variabilitu (Kabat, E. A. a kol., „Sekvence imunologicky zajímavých proteinů“, US Dept. Health and Human Services, 1983).

Ve světle těchto údajů byla homologie aminokyselin mezi V oblastmi myší monoklonální protilátky proti lidskému PTHrP určena s odvoláním na databázi aminokyselinových sekvencí zavedenou Kabatem a kol. Tedy CDR V oblastí byly stanoveny jak je ukázáno v tabulce 1.

Aminokyselinové sekvence CDR 1 až 3 ve V oblasti L řetězce jsou ukázány v SEQ ID NO: 59 až SEQ ID NO: 61; a aminokyselinové sekvence CDR 1 až 3 ve V oblasti H řetězce jsou ukázány v SEQ ID NO: 62 až SEQ ID NO: 64.

Tabulka 1

V oblast	SEQ ID NO:	CDR1	CDR2	CDR3
V oblast H řetězce	57	31 až 35	50 až 66	99 až 107
V oblast L řetězce	65	23 až 34	50 až 60	93 až 105

## Referenční příklad 3: Konstrukce chimerní protilátky

## (i) Konstrukce V oblasti H řetězce

Pro ligování do expresního vektoru, nesoucího genomovou DNA C oblasti Cy1 lidského H řetězce, byla klonovaná DNA kódující V oblast myšího H řetězce pozměněna pomocí PCR metody. Zpětný primer MBC1-S1 (SEQ ID NO: 7) byl navržen tak, aby hybridizoval s DNA sekvencí kódující 5'oblast vedoucí sekvence V oblasti a aby obsahoval jak Kozakovu konvenční sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987), tak rozpoznávací sekvenci pro HindIII. Přímý primer MBC1-a (SEQ ID NO: 8) byl navržen tak, aby hybridizoval s DNA sekvencí kódující 3'oblast J oblasti a aby obsahoval jak donorovou sestřihovou sekvenci, tak rozpoznávací sekvenci pro BamHI.

PCR reakce byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a připojeného pufu. Roztok PCR obsahoval (na 50 µl) 0,07 µg plazmidu MBC1H04 jako DNA matrici, 50 pmol primeru MBC1-a a 50 pmol primeru MBC1-S1, 2,5 jednotky



TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufru, přes což bylo navrstveno 50  $\mu$ l minerálního oleje. PCR probíhala 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 55 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 2 minut. Tyto PCR metodou amplifikované DNA fragmenty byly odděleny pomocí agarové gelové elektroforézy na gelu 3% Nu Sieve GTG agarósy (FMC Bio. Products).

Potom byl segment agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA dlouhý 437 párů bází vyříznut a DNA fragment byl z něho vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Vyčištěná DNA byla odebrána pomocí srážení ethanolem a potom byla rozpuštěna v 20  $\mu$ l roztoku, který obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Vzorek (1  $\mu$ l) výsledného roztoku DNA byl štěpen restrikcčními enzymy BamHI a HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpený roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a poté srážen ethanolem, aby byla získána DNA, o kterou se jedná.

Získaný DNA fragment HindIII-BamHI, který obsahuje gen kódující V oblast myšího H řetězce, byl klonován do vektoru pUC19, který byl štěpen HindIII a BamHI. Výsledný plazmid byl sekvenován na DNA sekvenátoru 373A (Perkin-Elmer) pomocí primerů M13-M4 a M13-RV a sekvenační soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Jako výsledek byl získán plazmid, který nesl gen se správnou nukleotidovou sekvencí, která kóduje V oblast myšího H řetězce odvozeného z hybridomu #23-57-137-1 a měl rozpoznávací sekvenci pro HindIII a Kozakovu sekvenci ve své 5'oblasti a rozpoznávací sekvenci pro BamHI ve své 3'oblasti, který byl označen „MBC1H/pUC19“.

(ii) Konstrukce V oblasti H řetězce pro přípravu cDNA chimerního H řetězce typu myš-člověk

Pro ligování s cDNA lidské C oblasti Cy1 H řetězce, byla DNA kódující V oblast myšího H řetězce, konstruovaná tak jak bylo popsáno výše, pozměněna pomocí PCR metody. Zpětný primer MBC1HVS2 (SEQ ID NO: 9) pro V oblast byl navržen tak, aby způsobil záměnu druhé aminokyseliny (asparaginu) v sekvenci kódující přední část vedoucí sekvence V oblasti H řetězce za glycin a aby obsahoval Kozakovu konvenční sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) a rozpoznávací sekvence pro HindIII a BamHI. Přímý primer MBC1HVR2 (SEQ ID NO: 10) pro V oblast H řetězce byl navržen tak, aby hybridizoval s DNA sekvencí kódující 3'oblast J oblasti, 5'oblast C oblasti a aby obsahoval rozpoznávací sekvence pro ApaI a SmaI.

PCR reakce byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a připojeného pufru. Roztok PCR obsahoval (na 50  $\mu$ l) 0,6  $\mu$ g plazmidu MBC1H/pUC19 jako DNA matrici, 50 pmol primeru MBC1HVS2 a 50 pmol primeru MBC1HVR2, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufru, přes což bylo navrstveno 50  $\mu$ l minerálního oleje. PCR probíhala 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 55 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 1 minuty. DNA fragmenty amplifikované PCR metodou byly odděleny pomocí agarové gelové elektroforézy na gelu 1% Sea Kem GTG agarósy (FMC Bio. Products). Potom byl segment agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA dlouhý 456 párů bází vyříznut a DNA fragment byl z něho vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Vyčištěná DNA byla vysrážena ethanolem a potom byla rozpuštěna v 20  $\mu$ l roztoku, který obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Výsledný DNA roztok (1  $\mu$ l) byl štěpen restričními enzymy EcoRI a SmaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpený roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a poté srážen ethanolem, aby byla získána DNA. Získaný DNA fragment EcoRI-SmaI, který obsahuje gen kódující V oblast myšího H řetězce, byl klonován do vektoru pUC19, který byl štěpen EcoRI a SmaI. Výsledný plazmid byl sekvenován na DNA sekvenátoru 373A (Perkin-Elmer) pomocí primerů M13-M4 a M13-RV a sekvenační soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). Jako výsledek byl získán plazmid, který nesl gen se správnou nukleotidovou sekvencí, která kóduje V oblast myšího H řetězce odvozeného z hybridomu #23-57-137-1 a měl rozpoznávací sekvence pro EcoRI a HindIII a Kozakovu sekvenci ve své 5'oblasti a rozpoznávací sekvence pro ApaI a SmaI ve své 3'oblasti, který byl označen „MBC1Hv/pUC19“.

### (iii) Konstrukce expresního vektoru pro H řetězec chimerní protilátky

cDNA obsahující DNA pro C oblast Cy1 H řetězce lidské protilátky byl připraven následujícím způsobem. mRNA byla připravena buněk CHO, do nichž byly vneseny jak expresní vektor DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f (viz WO 92/19 759) kódující genomové DNA V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky PM1 a C oblast IgG1 H řetězce lidské protilátky (N. Takahashi a kol., Cell 29, 671-679, 1982), tak expresní vektor RV1-PM1a (viz WO 92/19 759) kódující genomové DNA V oblasti L řetězce zušlechtěné protilátky PM1 a C oblast L řetězce k lidské protilátky. Za použití mRNA byla pomocí RT-PCR metody klonována cDNA obsahující V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky PM1 a C

oblast Cy1 lidské protilátky, poté byla vnesena do plazmidu pUC19 na místě HindIII-BamHI. Po sekvenování byl plazmid, který měl správnou nukleotidovou sekvenci označen „pRVh-PM1f-cDNA“.

Expresní vektor DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f, v němž jak místo HindIII, umístěné mezi SV40 promotorem a DHFR genem, tak EcoRI místo, umístěné mezi EF-1 $\alpha$  promotorem a genem pro V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky PM1 byly odstraněny, byl připraven pro konstrukci expresního vektoru pro cDNA, obsahující gen pro V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky PM1 a gen pro C oblast Cy1 lidské protilátky.

Získaný plazmid (pRVh-PM1f-cDNA) byl štěpen BamHI, konce byly zarovnány pomocí Klenowova fragmentu a dále štěpen HindIII, čímž byl získán HindIII-BamHI fragment se zarovnanými konci. Tento HindIII-BamHI fragment se zarovnanými konci byl ligován do výše zmíněného expresního vektoru DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f s odstraněnými místy HindIII a EcoRI, který byl štěpen HindIII a BamHI. Tak byl konstruován expresní vektor RVh-PM1f-cDNA, který obsahoval cDNA kódující V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky PM1 a C oblast Cy1 lidské protilátky.

Expresní vektor RVh-PM1f-cDNA obsahující cDNA kódující V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky PM1 a C oblast Cy1 lidské protilátky byl štěpen ApaI a BamHI, a byl z něho vybrán DNA fragment obsahující C oblast H řetězce. Výsledný DNA fragment byl vnesen do plazmidu MBC1Hv/pUC19, který byl štěpen ApaI a BamHI. Takto připravený plazmid byl označen „MBC1HcDNA/pUC19“. Tento plazmid obsahoval cDNA kódující V oblast H řetězce myší protilátky a C oblast Cy1 lidské protilátky, a měl ve své 5'oblasti rozpoznávací místa pro EcoRI a HindIII, a ve své 3'oblasti rozpoznávací místo pro BamHI.

Plazmid MBC1HcDNA/pUC19 byl štěpen EcoRI a BamHI a poskytl fragment obsahující nukleotidovou sekvenci kódující H řetězec chimerní protilátky. Výsledný DNA fragment byl vnesen do expresního vektoru pCOS1, který byl štěpen EcoRI a BamHI, čímž byl získán expresní vektor pro chimerní protilátku, který byl označen „MBC1HcDNA/pCOS1“. Zde byl expresní vektor pCOS1 konstruován za použití HEF-PMh-g  $\gamma$ 1 (viz WO 92/19 759) tím, že z něho byly štěpením EcoRI a SmaI odstraněny geny pro protilátky a poté byl ligován k adaptéru EcoRI-NotI-BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.).

Pro přípravu plazmidu pro expresi v buňkách CHO byl plazmid MBC1HcDNA/pUC19 štěpen EcoRI a BamHI a byl získán fragment obsahující gen pro



H řetězec chimerní protilátky. DNA fragment byl potom vnesen do expresního plazmidu pCHO, který byly štěpen EcoRI a BamHI, čímž byl získán expresní vektor pro chimerní protilátku, který byl označen „MBC1HcDNA/pCHO1“. Zde byl expresní vektor pCHO1 konstruován za použití DHFR- $\Delta$ E-rvH-PM1-f (viz WO 92/19 759) tím, že z něho byly štěpením EcoRI a SmaI odstraněny geny pro protilátky a poté byl ligován k adaptéru EcoRI-NotI-BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.).

## (2) Konstrukce C oblasti lidského L řetězce

### (i) Příprava klonovacího vektoru

Pro konstrukci pUC19 vektoru obsahujícího gen pro lidskou C oblast L řetězce byl připraven pUC19 vektor s odstraněným HindIII místem. Vektor pUC19 (2  $\mu$ g) byl štěpen v 20  $\mu$ l reakčním roztoku, obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotek HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Výsledný štěpený roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a poté srážen ethanolem, aby byla získána DNA o kterou se jedná.

Získaná DNA byla ponechána reagovat v 50  $\mu$ l reakčním roztoku, obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 0,5 mM dNTP a 6 jednotek Klenowova fragmentu (GIBCO BRL) při teplotě místnosti po dobu 20 minut, čímž byly konce DNA zarovnány. Tato reakční směs byla extrahována fenolem a chloroformem a poté srážen ethanolem, aby byla získána DNA vektoru.

Takto získaná DNA vektoru byla ponechána reagovat v 10  $\mu$ l reakčním roztoku, obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% polyethylenglykol-8000 (objem) a 0,5 jednotky T4 DNA ligázy (GIBCO BRL) při teplotě 16 °C po dobu 2 hodin, aby došlo k ligaci vektorové DNA. Reakční roztok (5  $\mu$ l) byl přidán ke 100  $\mu$ l roztoku obsahujícího kompetentní buňky E. coli JM109 (Nippon Gene Co., Ltd.) a výsledný roztok byl ponechán stát na ledu po dobu 30 minut, při teplotě 42 °C po dobu 1 minuty a dále na ledu po dobu 1 minuty. K reakčnímu roztoku bylo přidáno kultivační médium SOC (500  $\mu$ l) a poté bylo inkubováno při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Výsledný roztok byl vyset na 2xYT agarové médium (obsahující 50  $\mu$ g/ml ampicilínu), na které byly aplikovány X-gal a IPTG (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Press, 1989), a potom kultivovány při teplotě 37 °C přes noc, čímž byl získán transformant.

Transformant byl kultivován při teplotě 37 °C přes noc v médiu 2xYT (20 ml), obsahujícím 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce kultivačního média byla izolována



plazmidová DNA a čištěna pomocí soupravy Plasmid Mini Kit (QIAGEN) podle návodu přibaleného k soupravě. Vyčištěný plazmid byl štěpen HindIII. Plazmid u kterého bylo potvrzeno, že má odstraněné místo HindIII, byl označen „pUC19 ΔHindIII“.

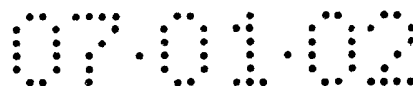
(ii) Konstrukce DNA kódující C oblast lidského L řetězce  $\lambda$

Je známo, že C oblast lidského L řetězce  $\lambda$  má alespoň čtyři isotypy a to  $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^-$ ,  $\text{Mcg}^-\text{Ke}^-\text{Oz}^-$ ,  $\text{Mcg}^-\text{Ke}^-\text{Oz}^+$  a  $\text{Mcg}^-\text{Ke}^+\text{Oz}^-$  (P. Dariavach, a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987). V EMBL databázi bylo provedeno vyhledávání C oblasti lidského L řetězce  $\lambda$ , homologního s C oblastí myšího L řetězce  $\lambda$  protilátky #23-57-137-1. Výsledkem bylo zjištění, že isotyp  $\text{Mcg}^+\text{Ke}^+\text{Oz}^-$  L řetězce  $\lambda$  lidské protilátky (přístupové č. X 57 819) (P. Dariavach, a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) vykazoval nejvyšší stupeň homologie s C oblastí myšího L řetězce  $\lambda$  protilátky #23-57-137-1, a to 64,4% homologii, pokud se jedná o sekvenci aminokyselin a 73,4% homologii, pokud se jedná o sekvenci nukleotidů.

Potom byl pomocí metody PCR konstruován gen kódující C oblast L řetězce  $\lambda$  lidské protilátky. Primery pro PCR byly syntetizovány pomocí 394 DNA/RNA syntetizátoru (ABI). Syntetizované primery byly následující: HLAMB1 (SEQ ID NO: 11) a HLAMB3 (SEQ ID NO: 13), které oba mají pozitivní DNA sekvenci; a HLAMB2 (SEQ ID NO: 12) a HLAMB4 (SEQ ID NO: 14), které oba mají negativní DNA sekvenci; přičemž každý primer obsahuje komplementární sekvence 20 až 23 párů bází na obou koncích.

Vnější primery HLAMBS (SEQ ID NO: 15) a HLAMBR (SEQ ID NO: 16) měly sekvence homologické k primeru HLAMB1, respektive k primeru HLAMB4. HLAMBS obsahoval rozpoznávací sekvence pro EcoRI, HindIII a BlnI a HLAMBR obsahoval rozpoznávací sekvenci pro EcoRI. V první PCR reakci byly provedeny reakce mezi HLAMB1 a HLAMB2 a mezi HLAMB3 a HLAMB4. Poté co byly reakce ukončeny, byly oba výsledné PCR produkty smíchány v ekvivalentních množstvích a v druhé PCR reakci sestaveny. K reakční směsi byly přidány vnější primery HLAMBS a HLAMBR. S touto reakční směsí byla provedena třetí PCR reakce, aby byla amplifikována DNA v celé délce.

Každá PCR reakce byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) podle návodu přibaleného k soupravě. V první PCR reakci bylo použito 100  $\mu\text{l}$  každého reakčního roztoku, obsahujícího 5 pmol HLAMB1, 0,5 pmol HLAMB2 a 5 jednotek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) nebo reakčního roztoku,



obsahujícího 0,5 pmol HLAMB3, 5 pmol HLAMB4 a 5 jednotek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a přes to bylo převrstveno 50  $\mu$ l minerálního oleje.

Ve druhé PCR reakci byla použita směs obou reakčních roztoků (každého 50  $\mu$ l) a přes to bylo převrstveno 50  $\mu$ l minerálního oleje. PCR reakce byla ponechána proběhnout 3 cykly za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 60 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty.

Ve třetí PCR reakci byl použit reakčních roztok, ke kterému byly přidány vnější primery HLAMBS a HLAMBR (každého 50 pmol). PCR reakce byla ponechána proběhnout 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 60 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty.

S fragmentem DNA získaným ve třetí PCR reakci byla provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání (NuSieve GTG Agarose, FMC) a byl oddělen a vyčištěn z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě.

Získaný DNA fragment byl štěpen v reakčním roztoku (20  $\mu$ l) obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM NaCl a 8 jednotek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Reakční roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a DNA byla získána pomocí srážení ethanolem. DNA byla rozpuštěna v roztoku (8  $\mu$ l) obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid pUC19  $\Delta$ HindIII (0,8  $\mu$ g), připravený jak bylo popsáno výše, byl štěpen EcoRI stejným způsobem, jak bylo popsáno výše. Štěpící roztok byl extrahován směsí fenol/chloroform a poté srážen ethanolem, čímž byl získán štěpený plazmid pUC19  $\Delta$ HindIII. Štěpený plazmid byl ponechán reagovat v reakčním roztoku (50  $\mu$ l) obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM MgCl<sub>2</sub> a alkalickou fosfatázu (E. coli C75; Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 30 minut aby došlo k defosforylaci (tj. působení BAP) plazmidu. Reakční roztok byl extrahován směsí fenol/chloroform a DNA byla získána pomocí srážení ethanolem. Takto získaná DNA byla rozpuštěna v roztoku (10  $\mu$ l) obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid pUC19  $\Delta$ HindIII (1  $\mu$ l) byl po působení alkalické fosfatázy ligován k výše získanému produktu PCR (4  $\mu$ l) pomocí ligační soupravy DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný plazmid byl vnesen do kompetentních buněk E. coli JM109 a byl získán transformant. Transformant byl kultivován přes noc v médiu 2xYT



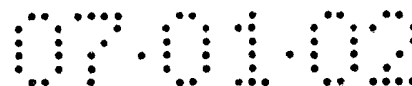
(2 ml), obsahujícího 50 µg/ml ampicilínu. Z buněčné frakce byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

U získaného plazmidu byla sekvenována část obsahující klonovanou DNA. Sekvenování bylo provedeno na DNA sekvenátoru 373A (ABI) pomocí primerů M13-M4 a M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledkem bylo zjištění, že klonovaná DNA tam má delecí 12 párů bází. Plazmid byl označen „C λ Δ/pUC19“. Potom byly kvůli náhradě deletované části znovu syntetizovány primery HCMLS (SEQ ID NO: 17) a HCLMR (SEQ ID NO: 18) a za použití těchto primerů byla pomocí metody PCR zrekonstruována DNA se správnou sekvencí.

V první PCR reakci byl použit jako matrice plazmid CλΔ/pUC19, který má delecí DNA, a reakce byla provedena s každou soupravou primerů, jak s HLAMBS a HCLMS tak s HCLMS a HLAMB4. Produkty PCR byly vyčištěny odděleně. Ve druhé PCR reakci byly produkty PCR sestaveny dohromady. Ve třetí PCR reakci byly k produktu druhé PCR reakce přidány vnější primery HLAMBS a HLAMB4, aby byla amplifikována DNA v celé délce.

V první PCR reakci byl použit reakční roztok (100 µl) obsahující 0,1 µg plazmidu CλΔ/pUC19 jako matrice, buď 50 pmol každého primeru HLAMBS a HCLMR nebo 50 pmol každého primeru HCLMS a HLAMB4, a 5 jednotek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a přes to bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR reakce byla ponechána proběhnout 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 60 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty.

S produkty PCR první PCR reakce, HLAMBS-HCLMR (236 párů bází) a HCLMS-HLAMB4 (147 párů bází), byla odděleně provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, aby byly DNA fragmenty izolovány. DNA fragmenty byly odebrány a vyčištěny z gelů pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Ve druhé PCR reakci bylo použito 20 µl reakčního roztoku obsahujícího 40 ng každého z vyčištěných fragmentů a 1 jednotka TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a přes to bylo převrstveno 25 µl minerálního oleje. PCR reakce byla ponechána proběhnout 5 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 60 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty. Ve třetí PCR reakci bylo použito 100 µl reakčního roztoku obsahujícího 2 µl reakčního roztoku získaného ve druhé PCR reakci, 50 pmol každého vnějšího primeru HLAMBS a HLAMB4, a 5 jednotek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a přes to bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR reakce byla ponechána proběhnout 30



cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 60 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty, čímž byl získán DNA fragment dlouhý 357 párů bází (třetí PCR produkt). S DNA fragmentem byla provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, aby byl DNA fragment izolován. Výsledný DNA fragment byl odebrán a vyčištěn z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101).

Vzorek takto získaného DNA fragmentu (0,1 µg) byl štěpen EcoRI a potom klonován do plazmidu pUC19ΔHindIII, na který bylo předtím působeno alkalickou fosfatázou. Výsledný plazmid byl vnesen do kompetentních buněk E. coli JM109 a byl získán transformant. Transformant byl kultivován přes noc ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50 µg/ml ampicilínu. Z buněčné frakce byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

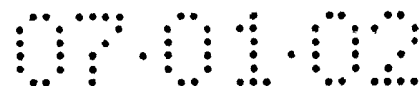
Vyčištěný plazmid byl sekvenován na DNA sekvenátoru 373A (ABI) pomocí primerů M13-M4 a M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Plazmid u kterého bylo potvrzeno, že obsahuje správnou nukleotidovou sekvenci bez jakékoli delece, byl označen „CM/pUC19“.

(iii) Konstrukce genu kódujícího C oblast lidského L řetězce κ

Fragment DNA kódující C oblast lidského L řetězce κ byl klonován z plazmidu HEF-PM1k-gk (WO 92/19 759) pomocí metody PCR. Přímý primer HKAPS (SEQ ID NO: 19) byl navržen tak, aby obsahoval rozpoznávací sekvence pro EcoRI, HindIII a BlnI, a zpětný primer HKAPA (SEQ ID NO: 20) byl navržen tak, aby obsahoval rozpoznávací sekvenci pro EcoRI. Tyto primery byly syntetizovány na 394 DNA/RNA syntetizátoru (ABI).

PCR reakce byla provedena za použití 100 µl reakčního roztoku, obsahujícího 0,1 µg plazmidu HEF-PM1k-gk jako matrici, 50 pmol každého z primerů HKAPS a HKAPA, a 5 jednotek TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), a přes to bylo převrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR reakce byla ponechána proběhnout 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 60 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty, čímž vznikl PCR produkt dlouhý 360 párů bází. DNA fragment byl izolován a vyčištěn pomocí elektroforézy ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání a potom odebrán a vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101).

Takto získaný DNA fragment byl štěpen EcoRI a potom klonován do plazmidu pUC19(HindIII, na který bylo předtím působeno alkalickou fosfatázou. Výsledný plazmid byl vnesen do kompetentních buněk E. coli JM109 a byl získán transformant.



Transformant byl kultivován přes noc ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50 µg/ml ampicilínu. Z buněčné frakce byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčištěný plazmid byl sekvenován na DNA sekvenátoru 373A (ABI) pomocí primerů M13-M4 a M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.). Plazmid u kterého bylo potvrzeno, že obsahuje správnou nukleotidovou sekvenci, byl označen „Ck/pUC19“.

### (3) Konstrukce expresního plazmidu pro L řetězec chimerní protilátky

Byl konstruován expresní plazmidu pro L řetězec chimerní protilátky #23-57-137-1. Gen kódující V oblast L řetězce chimerní protilátky #23-57-137-1 byl ligován do HindIII-BlnI místa (umístěného na samém počátku C oblasti lidské protilátky) každého z plazmidů Ck/pUC19 a Ck/pUC19, čímž byly získány pUC19 vektory obsahující DNA, které kódují V oblast L řetězce protilátky #23-57-137-1 a buď C oblast L řetězce λ respektive C oblast L řetězce κ. Každý z výsledných vektorů potom byl štěpen EcoRI, aby byl oddělen gen pro L řetězec chimerní protilátky. Gen byl klonován do HEF expresního vektoru.

Tedy DNA fragment kódující V oblast L řetězce protilátky #23-57-137-1 byl z plazmidu MBC1L24 klonován pomocí PCR metody. Primery použité v této PCR metodě byly odděleně syntetizovány pomocí DNA/RNA syntezátoru model 394 (ABI). Zpětný primer MBCCHL1 (SEQ ID NO: 21) byl navržen tak, aby obsahoval rozpoznávací sekvenci HindIII a Kozakovu sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) a přímý primer MBCCHL3 (SEQ ID NO: 22) byl navržen tak, aby obsahoval rozpoznávací sekvence pro BglII a EcoRI.

PCR reakce byla provedena za použití 100 µl reakčního roztoku, obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,1 µg MBC1L24, 50 pmol každého z primerů MBCCHL1 a MBCCHL3 a 1 µl AmpliTaq (PERKIN ELMER), a přes to bylo navrstveno 50 µl minerálního oleje. PCR reakce byla ponechána proběhnout 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 45 sekund; 60 °C dobu 45 sekund; a 72 °C po dobu 2 minut.

S PCR produktem dlouhým 444 párů bází byla provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, a byl oddělen a vyčištěn z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Vyčištěný PCR produkt byl rozpuštěn ve 20 µl roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. PCR produkt (1 µl) byl štěpen ve 20 µl roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM

DTT, 50 mM NaCl, 8 jednotek HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 8 jednotek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící roztok byl extrahován směsí fenol/chloroform a DNA o kterou se jedná z něho byla získána srážením ethanolem. DNA byla rozpuštěna v 8 µl roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Stejným způsobem byl plazmid pUC19 (1 µg) štěpen HindIII a EcoRI, extrahován směsí fenol/chloroform a poté srážen ethanolem. Získaný štěpený plazmid byl opracován alkalickou fosfatázou (*E. coli* C75; Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný reakční roztok byl extrahován směsí fenol/chloroform a DNA z něho byla získána srážením ethanolem. DNA byla rozpuštěna v 10 µl roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid pUC19, na který bylo působeno alkalickou fosfatázou (1 µl), byl ligován s výše získaným PCR produktem (4 µl) pomocí ligační soupravy DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Výsledný plazmid byl vnesen do kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippon Gene Co., Ltd.) stejným způsobem jak bylo popsáno výše, a byl získán transformant. Transformant byl vyset na agar s médiem 2xYT, obsahujícím 50 µg/ml ampicilínu a kultivován při teplotě 37 °C přes noc. Výsledný transformant byl potom kultivován při teplotě 37 °C přes noc ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50 µg/ml ampicilínu. Z buněčné frakce byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Po určení nukleotidové sekvence byl plazmid, u kterého bylo potvrzeno že má správnou sekvenci nukleotidů, označen „CHL/pUC19“.

Každý z plazmidů CM/pUC19 a Ck/pUC19 (1 µg každého) byl štěpen v 20 µl reakčním roztoku, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 jednotky BlnI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a DNA z něho byla získána pomocí srážení ethanolem. Na DNA bylo působeno alkalickou fosfatázou při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Reakční roztok byl extrahován fenolem a chloroformem a DNA byla získána pomocí srážení ethanolem. DNA byla rozpuštěna v 10 µl roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Plazmid CHL/pUC19 (8 µg), který obsahoval DNA kódující V oblast L řetězce protilátky #23-57-137-1 byl štěpen HindIII a BlnI stejným způsobem, jak bylo popsáno výše a vznikl tak DNA fragment dlouhý 409 párů bází. S fragmentem DNA byla



provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání a potom byl oddělen a vyčištěn z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). DNA byla rozpuštěna v 10  $\mu$ l roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

DNA pro V oblast L řetězce (4  $\mu$ l) byla klonována do 1  $\mu$ l každého z plazmidů C $\lambda$ /pUC19 a C $\kappa$ /pUC19, na které bylo před tím působeno alkalickou fosfatázou, a potom vneseny do kompetentních buněk E. coli JM109, aby byl získán transformant. Transformant byl kultivován přes noc ve 3 ml média 2xYT, obsahujícího 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Takto připravené dva plazmidy byly označeny „MBC1L( $\lambda$ )/pUC19“ respektive „MBC1L( $\kappa$ )/pUC19“.

Každý z plazmidů MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 a MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 byl štěpen EcoRI a potom byla provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání. DNA fragment dlouhý 743 párů bází byl oddělen a vyčištěn z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101), a potom byl rozpuštěn v 10  $\mu$ l roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Expresní vektor (plazmid HEF-PM<sup>o</sup>k-gk) (2,7  $\mu$ g) byl štěpen EcoRI a potom extrahován fenolem a chloroformem a DNA z něho byla získána pomocí srážení ethanolem. Na DNA fragment bylo působeno alkalickou fosfatázou a potom byla provedena elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání. DNA fragment dlouhý 6561 párů bází byl z gelu izolován a vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Vyčištěný DNA fragment byla rozpuštěn v 10  $\mu$ l roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

HEF vektor opracovaný alkalickou fosfatázou (2  $\mu$ l) byl ligován s EcoRI fragmentem (3  $\mu$ l) každého z plazmidů MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 a MBC1L( $\kappa$ )/pUC19. Produkt ligace byl vnesen do kompetentních buněk E. coli JM109 a byl získán transformant. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčištěný plazmid byl štěpen v 20  $\mu$ l reakčním roztoku obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotek EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 jednotky PvuI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Tato reakce dávala štěpené fragmenty dlouhé 5104/2195 párů bází v případě, že fragment byl vložen ve správné orientaci, popřípadě fragmenty dlouhé 4378/2926

párů bází v případě, že fragment byl vložen v orientaci opačné. Plazmid, u kterého bylo potvrzeno že má fragment ve správné orientaci, byl označen „MBC1L( $\lambda$ )/neo“ pro plazmidMBC1L( $\lambda$ )/pUC19 nebo „MBC1L( $\kappa$ )/neo“ pro plazmidMBC1L( $\kappa$ )/pUC19.

#### (4) Transfekce buňky COS-7

Aby byla zhodnocena vazebná aktivita k antigenu a neutralizační aktivita chimerních protilátek, byly výše připravené expresní plazmidy přechodně exprimovány v buňce COS-7.

Přechodná exprese chimerních protilátek byla provedena za použití všech kombinací plazmidů MBC1HcDNA/pCOS1 a MBC1L( $\lambda$ )/neo a plazmidů MBC1HcDNA/pCOS1 a MBC1L( $\kappa$ )/neo tak, že byla buňka COS-7 současně transfekována plazmidy elektroporézováním pomocí zařízení Gene Pulser (Bio Rad). Tedy, plazmidy (10  $\mu$ g každého) byly přidány k suspenzi buněk COS-7 (0,8 ml;  $1 \times 10^7$  buněk/ml) v PBS(-). Na výsledný roztok bylo působeno pulsy s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 2  $\mu$ F, které způsobily elektroporaci. Po 10 minutovém zotavovacím období při teplotě místnosti byly elektroporézované buňky suspendovány v médiu DMEM (GIBCO), obsahujícím 2% fetální telecí sérum s ultranízkým obsahem IgG (GIBCO), a potom kultivovány v 10 cm kultivačních miskách v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po kultivaci 72 hodin byl z kultur odebrán supernatant, cetrifugován aby byly odstraněny buněčné zbytky, a použit jako vzorek pro následující test ELISA. Při tomto postupu bylo čištění chimerní protilátky ze supernatantu kultur buněk COS-7 provedeno pomocí soupravy AffiGel Protein A MAPSII Kit (Bio Rad) podle návodu přibaleného k soupravě.

#### (5) ELISA

##### (i) Určování koncentrace protilátky

Destička testu ELISA pro určení koncentrace protilátky byla připravena následujícím způsobem. Každá z 96 jamek destičky testu ELISA (Maxisorp, NUNC) byla potažena 100  $\mu$ l potahovacího pufru (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,02% NaN<sub>3</sub>), doplněného 1  $\mu$ g/ml kozí protilátky proti lidskému IgG (TAGO) a potom blokována 200  $\mu$ l ředícího pufru [50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 1% hovězí sérumalbumin (BSA); pH 7,2]. Ke každé jamce destičky byl přidán vzorek sériového ředění supernatantu z kultur buněk COS-7, v nichž byla každá chimerní protilátka exprimována, nebo byl k jamce destičky přidán vzorek sériového ředění chimerní protilátky jako takové, ve vyčištěné formě. Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a potom promyta PBS-Tween 20. Ke každé jamce

destičky bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované a alkalickou fosfatázou (TAGO). Potom co byla destička inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a promyta PBS-Tween 20, byl ke každé jamce destičky přidán roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). U roztoku byla měřena jeho absorbance při 405 nm pomocí odečítacího zařízení pro destičky Microplate Reader (Bio Rad), aby byla zjištěna koncentrace protilátky. Při tomto měření byl jako standardní látka použit čištěný Hu IgG1  $\lambda$  (The Binding Site).

(ii) Určování schopnosti vázat antigen

Destička testu ELISA pro určení schopnosti protilátky vázat antigen, byla připravena následujícím způsobem. Každá z 96 jamek destičky testu ELISA byla potažena 100  $\mu$ l potahovacího pufru doplněného 1  $\mu$ g/ml lidského PTHrP (1-34) (Ústav pro výzkum peptidů) a potom blokována 200  $\mu$ l ředícího pufru. Ke každé jamce destičky byl přidán vzorek sériového ředění supernatantu z kultur buněk COS-7, v nichž byla každá chimerní protilátka exprimována, nebo byl k jamce destičky přidán vzorek sériového ředění chimerní protilátky jako takové, ve vyčištěné formě. Potom co byla destička inkubována při teplotě místnosti a promyta PBS-Tween 20, bylo ke každé jamce destičky přidáno 100  $\mu$ l roztoku kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované a alkalickou fosfatázou (TAGO). Potom co byla destička inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a promyta PBS-Tween 20, byl ke každé jamce destičky přidán roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). U roztoku byla měřena jeho absorbance při 405 nm pomocí odečítacího zařízení pro destičky Microplate Reader (Bio Rad).

Výsledkem bylo zjištění, že chimerní protilátky mají schopnost vázat se na lidský PTHrP (1-34) a klonovaná V oblast myší protilátky má správnou strukturu (Obr. 5). Bylo také zjištěno, že nebyl rozdíl ve schopnosti vázat se na PTHrP (1-34) mezi C oblastí L řetězce  $\lambda$  chimerní protilátky a C oblastí L řetězce  $\kappa$  chimerní protilátky. Proto byl L řetězce  $\lambda$  zušlechtěné protilátky použit pro konstrukci C oblastí L řetězce zušlechtěné protilátky.

(6) Získání buněčné linie CHO schopné stabilní produkce chimerních protilátek

Aby byla získána buněčná linie schopná produkovat chimerní protilátky stabilně, byly výše připravené expresní plazmidy vneseny do buněk CHO (DXB11).

Pro získání buněčné linie schopné produkovat chimerní protilátky stabilně, byla v buňkách CHO použita každá z následujících kombinací expresních plazmidů:

MBC1HcDNA/pCHO1 a MBC1L( $\lambda$ )/neo; a MBC1HcDNA/pCHO1 a MBC1L( $\kappa$ )/neo. Buňky CHO byly současně transfekovány plazmidy elektroporováním pomocí zařízení Gene Pulser (Bio Rad) následujícím způsobem. Expresní plazmidy byly odděleně štěpeny restrikcí enzymem PvuI, aby byly získány lineární DNA. Výsledné DNA byly extrahovány fenolem a chloroformem a získány srážením ethanolem. Takto připravená plazmidová DNA byla použita pro elektroporaci. Tedy, každý z plazmidů (10  $\mu$ g každého) byl přidán k 0,8 ml suspenzi buněk CHO v PBS(-) ( $1 \times 10^7$  buněk/ml). Na výsledný roztok bylo působeno pulsy s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 25  $\mu$ F. Po 10 minutovém zotavovacím období při teplotě místnosti byly elektroporované buňky suspendovány v médiu MEM- $\alpha$  (GIBCO), obsahujícím 10% fetální telecí sérum (GIBCO). Výsledná suspenze byla kultivována ve třech destičkách s 96 jamkami (Falcon) v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Jeden den po tom, co byla kultivace započata, bylo médium zaměněno za médium selekční [médium MEM- $\alpha$  bez ribonukleozidů nebo deoxyribonukleozidů (GIBCO), obsahující 10% fetální telecí sérum (GIBCO) a 500 mg/ml Geneticinu (síran G418; GIBCO)]. Z kultivačního média byly vybírány buňky, do kterých byl vnesen gen protilátky. Selekční médium je zaměněno za čerstvé. Dva týdny po výměně média byly buňky pozorovány pod mikroskopem. Když byl pozorován uspokojivý růst buněk, bylo určováno množství produkovaných protilátek ELISA testem, který byl popsán výše. Z buněk byly vybrány ty, které produkovaly velké množství protilátek.

Potom byl rozsah kultivace získané buněčné linie, schopné stabilní produkce protilátek, zvětšen použitím láhví v roleru, za použití média MEM bez ribonukleozidů nebo deoxyribonukleozidů, obsahujícího 2% fetální telecí sérum s ultranízkým obsahem IgG. Třetí a čtvrtý den kultivace byl supernatant z kultur odebrán a filtrován na 0,2  $\mu$ m filtru (Millipore), aby z něho byly odstraněny zbytky buněk.

Čištění chimerních protilátek ze supernatantu kultur buněk CHO bylo provedeno pomocí sloupce POROS s proteinem A (PerSeptive Biosystems) na zařízení ConSep LC100 (Millipore), podle návodu přibaleného k soupravě. Vyčištěné chimerní protilátky byly použity jako vzorky pro určování neutralizační aktivity a pro testování terapeutické účinnosti na zvířecích modelech hyperkalcinémie. Koncentrace a vazebná aktivita k antigenu byla u čištěných chimerních protilátek určována pomocí stejného ELISA systému, který byl popsán výše.

#### Referenční příklad 4: Konstrukce zušlechtěné protilátky

##### (1) Konstrukce H řetězce zušlechtěné protilátky

##### (i) Konstrukce V oblasti zušlechtěného H řetězce

H řetězec zušlechtěné protilátky #23-57-137-1 byl připraven technikou připojování CDR oblastí pomocí metody PCR. Pro přípravu H řetězce zušlechtěné protilátky #23-57-137-1 (verze „a“), která má FR odvozené z lidské protilátky S31 679 (NFRB-PDB; Cuisinier, A. M. a kol., Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993), bylo použito šest následujících primerů: primery pro připojení CDR: MBC1HGP1 (SEQ ID NO: 23) a MBC1HGP3 (SEQ ID NO: 24) (oba obsahují pozitivní DNA sekvenci) a MBC1HGP2 (SEQ ID NO: 25) a MBC1HGP4 (SEQ ID NO: 26) (oba obsahují negativní DNA sekvenci), přičemž všechny obsahují na obou svých koncích komplementární sekvenci dlouhou 15 až 21 párů bází; a vnější primery: MBC1HVS1 (SEQ ID NO: 27) a MBC1HVR1 (SEQ ID NO: 28), které mají homologii k primerům pro připojení CDR MBC1HGP1, respektive MBC1HGP4.

Primery pro připojení CDR MBC1HGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4 byly odděleny na denaturačním polyakrylamidovém gelu s močovinou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), a extrahovány z něj pomocí rozdrčení a nasáknutí rozpouštědlem (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) následujícím způsobem.

Každý z primerů pro připojení CDR (1 nmol) byl rozdělen na 6% denaturačním polyakrylamidovém gelu, aby byly získány DNA fragmenty. Mezi výslednými DNA fragmenty byl DNA fragment požadované délky detekován pomocí ozáření paprsky UV na tenké vrstvě gelu kysličníku křemičitého a potom z něho izolován metodou rozdrčení a nasáknutí rozpouštědlem. Výsledná DNA byla rozpuštěna v 20  $\mu$ l roztoku, který obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Reakce PCR byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). PCR reakční roztok (100  $\mu$ l) obsahoval v pufru 1  $\mu$ l každého z výše uvedených primerů pro připojení CDR MBC1HVS1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4, 0,25 mM dNTP a 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq. PCR byla ponechána proběhnout 5 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 55 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty. K výslednému reakčnímu roztoku byly přidány vnější primery MBC1HVS1 a MBC1HVR1 (50 pmol každého). S touto reakční směsí byla PCR reakce ponechána proběhnout dalších 30 cyklů za

stejných podmínek. S takto amplifikovaným fragmentem DNA byla provedena elektroforéza na gelu 4% Nu Sieve GTG agarózy (FMC Bio. Products).

Segment agarózy obsahující DNA fragment dlouhý 421 párů bází byl vyříznut a DNA z něho byla vyčištěna pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Takto vyčištěný byl vysrážen ethanolem a potom rozpuštěn v 20  $\mu$ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Výsledná PCR reakční směs byla použita pro klonování DNA fragmentu do plazmidu pUC19, který byl štěpen BamHI a HindIII, a potom byla určena nukleotidová sekvence výsledného plazmidu. Plazmid, který měl správnou nukleotidovou sekvenci, byl označen „hMBCHv/pUC19“.

#### (ii) Konstrukce cDNA V oblasti zušlechtěného H řetězce

Pro ligování k cDNA C oblasti Cy1 zušlechtěného H řetězce, byla DNA V oblasti zušlechtěného H řetězce, konstruovaná ve výše popsaném kroku, pozměněna pomocí PCR metody. Pro PCR metodu byl navržen zpětný primer MBC1HVS2 tak, aby hybridizoval s DNA sekvencí kódující 5'oblast vedoucí sekvence V oblasti a aby obsahoval Kozakovu konvenční sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) a rozpoznávací sekvence pro HindIII a EcoRI; a přímý primer MBC1HVR2 byl navržen tak, aby hybridizoval jak s DNA sekvencí kódující 3'oblast J oblasti, tak s DNA sekvencí kódující 5'oblast C oblasti a aby obsahoval rozpoznávací sekvence pro ApaI a SmaI.

PCR reakce byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a připojeného pufru. Roztok PCR obsahoval 0,4  $\mu$ g plazmidu hMBC1Hv/pUC19 jako DNA matici, 50 pmol každého z primerů MBC1HVS2 a MBC1HVR2, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq a 0,25 mM dNTP v pufru. PCR probíhala 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 55 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 1 minuty. Takto amplifikované DNA fragmenty byly odděleny pomocí agarové gelové elektroforézy na gelu 3% Nu Sieve GTG agarose (FMC Bio. Products).

Segment agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA dlouhý 456 párů bází byl vyříznut a DNA fragment byl z něho vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Takto vyčištěný DNA fragment byl vysrážen ethanolem a potom byl rozpuštěn v 20  $\mu$ l roztoku, který obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA. Takto získaný PCR reakční roztok byl použit pro klonování DNA fragmentu do plazmidu pUC19, který byl štěpen restrikcími enzymy

EcoRI a SmaI, a potom byl výsledný plazmid sekvenován. Jako výsledek byl získán plazmid, který obsahoval DNA kódující V oblast myšního H řetězce odvozenou z hybridomu #23-57-137-1, dále obsahoval rozpoznávací sekvence pro EcoRI a HindIII a Kozakovu sekvenci v 5'oblasti, a rozpoznávací sekvence pro ApaI a SmaI v 3'oblasti, byl označen „hMBC1Hv/pUC19“.

#### (2) Konstrukce expresního vektoru pro H řetězec zušlechtěné protilátky

Plazmid RVh-PM1f-cDNA, obsahující cDNA sekvenci pro H řetězec protilátky hPM1, byl štěpen ApaI a BamHI, aby byl získán DNA fragment obsahující DNA, která kóduje C oblast H řetězce. DNA fragment byl vnesen do plazmidu hMBC1Hv/pUC19, který byl štěpen ApaI a BamHI. Získaný plazmid byl označen „hMBC1HcDNA/pUC19“. Tento plazmid obsahoval jak DNA kódující V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky #23-57-137-1, tak DNA kódující C oblast Cy1 lidského H řetězce, a měl rozpoznávací sekvence pro HindIII a EcoRI ve své 5'oblasti a rozpoznávací sekvenci pro BamHI ve své 3'oblasti. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence zušlechtěného H řetězce verze „a“, nesená na plazmidu hMBC1HcDNA/pUC19, jsou ukázány v SEQ ID NO: 58, respektive SEQ ID NO: 56.

Plazmid hMBC1HcDNA/pUC19 byl štěpen EcoRI a BamHI, čímž byl získán DNA fragment obsahující DNA, která kóduje H řetězec. DNA fragment byl vnesen do expresního plazmidu pCOS1, který štěpen EcoRI a BamHI. Jako výsledek byl získán expresní plazmid pro zušlechtěnou protilátku, který byl označen „hMBC1HcDNA/pCOS1“.

Aby byl připraven plazmid používaný k exprimování v buňkách CHO, byl plazmid hMBC1HcDNA/pUC19 který štěpen EcoRI a BamHI, čímž byl získán DNA fragment, který obsahuje DNA kódující H řetězec. DNA fragment byl vnesen do expresního plazmidu pCOS1, který štěpen EcoRI a BamHI. Jako výsledek byl získán expresní plazmid pro zušlechtěnou protilátku, který byl označen „hMBC1HcDNA/pCOS1“.

#### (3) Konstrukce V oblasti hybridního L řetězce

##### (i) Příprava hybridní protilátky FR1,2/FR3,4

Byl konstruován gen pro FR hybridního L řetězce, který má jak FR oblasti ze zušlechtěné protilátky tak FR z myší (chimerní) protilátky, a každá oblast byla z hlediska zušlechtění zhodnocena. V tomto kroku byla za využití restričního místa pro AflII, umístěného v CDR2, připravena hybridní protilátka, která má obě FR1 a FR2 odvozené z lidské protilátky a obě FR3 a FR4 má odvozené z myší protilátky.

Plazmidy MBC1L( $\lambda$ )/neo a hMBC1L( $\lambda$ )/neo (10  $\mu$ g každého) byly odděleně štěpeny v 100  $\mu$ l reakčního roztoku, obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% (hmotnost/objem) BSA a 10 jednotek AflIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. U reakčního roztoku byla provedena elektroforéza ve 2% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, čímž byly z plazmidu MBC1L( $\lambda$ )/neo získány DNA fragmenty dlouhé 6282 párů bází (označen jako „c1“) a 1022 párů bází (označen jako „c2“) nebo DNA fragmenty dlouhé 6282 párů bází (označen jako „h1“) a 1022 párů bází (označen jako „h2“) z plazmidu hMBC1L( $\lambda$ )/neo. Tyto DNA fragmenty byly odděleny a vyčištěny z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101).

Každý z fragmentů c1 a h1 (1  $\mu$ g každého) byl opracován alkalickou fosfatázou. DNA fragment byl extrahován fenolem a chloroformem, získán srážením ethanolem a potom rozpuštěn v 10  $\mu$ l roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

DNA fragmenty c1 a h1 opracované alkalickou fosfatázou (1  $\mu$ l každého) byly ligovány s h2 DNA fragmentem, respektive c2 DNA fragmentem (4  $\mu$ l každého), (při teplotě 4 °C přes noc). Každý z ligačních produktů byl vnesen do kompetentní buňky *E. coli* JM109, aby vznikl transformant. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT, obsahujícím 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce kultivačního média byl plazmid vyčištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Vyčištěný plazmid byl štěpen ve 20  $\mu$ l reakčním roztoku, obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, a buď 2 jednotky ApaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) nebo 8 jednotek BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.), při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Bylo očekáváno, že pokud budou c1-h2 správně spojeny, touto štěpicí reakcí by vznikly fragmenty dlouhé 5560, 1246 a 598 párů bází (v případě štěpení pomocí ApaI) nebo fragmenty dlouhé 7134 a 269 párů bází (v případě štěpení pomocí BamHI/HindIII). Na základě tohoto očekávání byly určovány požadované plazmidy.

Expresní vektor kódující L řetězec hybridní protilátky lidské FR1,2/myší FR3,4 byl označen „h/mMBC1L( $\lambda$ )/neo“. Na druhé straně, protože nemohl být získán klon pro h1-c1, byla provedena rekombinace do pUC vektoru a potom byl výsledný rekombinanční produkt klonován do HEF vektoru. Při tomto postupu byly jako matrice použity plazmidy hMBC1L $\lambda$ /pUC19, který obsahoval DNA kódující V oblast L řetězce zušlechtěné protilátky bez jakýchkoli aminokyselinových záměn, a plazmid hMBC1L $\lambda$ -pUC19, obsahoval DNA kódující V oblast L řetězce zušlechtěné protilátky s

aminokyselinovou záměnou v pozici 91. aminokyseliny, kde byl tyrozin v FR3 (tj. 87. aminokyselina podle Kabatova pravidla) zaměněn za izoleucin.

Plazmidy MBC1L( $\lambda$ )/pUC19, hMBC1La $\lambda$ /pUC19 a hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19 (10  $\mu$ l každého) byly odděleně štěpeny v 30  $\mu$ l reakčním roztoku, obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% (hmotnost/objem) BSA, 16 jednotek HindIII a 4 jednotky AflII, při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. S reakčními roztoky byly odděleně provedeny elektroforézy ve 2% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, čímž byl z plazmidu MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 získán DNA fragment dlouhý 215 párů bází (označený jako „c2“) a z obou plazmidů hMBC1La $\lambda$ /pUC19 a hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19 byl získán DNA fragment dlouhý 3218 párů bází (označené jako „ha1“, respektive „hd1“). Tyto DNA fragmenty byly odebrány a vyčištěny pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101).

Každý z ha' a hd' fragmentů byl ligován s c2' fragmentem a potom vnesen do komplementárních buněk E. coli JM109, a připraven tak transformant. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce kultivačního média byl izolován plazmid pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) Plasmid Mini Kit (QIAGEN). Takto připravené plazmidy byly označeny „m/hMBC1La $\lambda$ /pUC19“ pro plazmid obsahující fragment ha1', a „m/hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19“ pro plazmid obsahující fragment hd1'.

Každý z plazmidů m/hMBC1La $\lambda$ /pUC19 a m/hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19 byl štěpen EcoRI. S DNA fragmentem dlouhým 743 párů bází byla provedena elektroforéza ve 2% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, a byl oddělen a vyčištěn z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Výsledný DNA fragment byl rozpuštěn ve 20  $\mu$ l roztoku obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Každý z DNA fragmentů (4  $\mu$ l každého) byl ligován do vektoru HEF (1  $\mu$ l), opracovaného alkalickou fosfatázou, jehož příprava byla popsána výše. Ligační produkt byl vnesen do kompetentních buněk E. coli JM109, aby vznikl transformant. Transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce kultivačního média byl plazmid vyčištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Každý z vyčištěných plazmidů byl štěpen v 20  $\mu$ l reakčním roztoku, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 jednotek HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 2 jednotky PvuI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě

37 °C po dobu 1 hodiny. Bylo očekáváno, že pokud bude DNA fragment vložen do plazmidu ve správné orientaci, touto štěpící reakcí by vznikly fragmenty dlouhé 5104 a 2195 párů bází, zatímco pokud bude DNA fragment vložen do plazmidu v orientaci opačné, touto štěpící reakcí by vznikly fragmenty dlouhé 4378 a 2926 párů bází. Na základě tohoto očekávání byla DNA plazmidu určována. Takto získané plazmidy byly expresní vektory kódující L řetězec hybridní protilátky myší FR1,2/lidské FR3,4, které byly označeny jako expresní vektory „m/hMBC1La/neo“, respektive „m/hMBC1Ld/neo“.

(ii) Příprava hybridní protilátky FR1/FR2

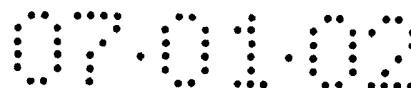
Hybridní protilátka FR1/FR2 byla připravena stejným způsobem, jak bylo vyloženo výše, za použití restrikčního místa SnaBI, nacházejícího se v CDR1.

Plazmidy MBC1L( $\lambda$ )/neo a h/mMBC1L( $\lambda$ )/neo (10  $\mu$ g každého) byly odděleně štěpeny v 20  $\mu$ l reakčního roztoku, obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,01% (hmotnost/objem) BSA a 6 jednotek SnaBI (Takara Shuzo Co., Ltd.) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Výsledný reakční roztok byl dále štěpen v 50  $\mu$ l reakčního roztoku, obsahujícího 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) BSA a 6 jednotek PvuII při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

U výsledných reakčních roztoků byla provedena elektroforéza v 1,5% agarózovém gelu s nízkou teplotou tání, čímž byly z plazmidu MBC1L( $\lambda$ )/neo získány DNA fragmenty dlouhé 4955 párů bází (m1) a 2349 párů bází (m2) a DNA fragmenty dlouhé 4955 párů bází (hm1) a 2349 párů bází (hm2) z plazmidu h/mMBC1L( $\lambda$ )/neo. Tyto DNA fragmenty byly odděleny a vyčištěny z gelu pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101). Každý z fragmentů byl rozpuštěn v 40  $\mu$ l roztoku obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Fragmenty m1 a hm1 (1  $\mu$ l každého) byly ligovány s fragmenty hm2, respektive m2 (4  $\mu$ l každého). Každý z výsledných ligačních produktů byl vnesen do kompetentní buňky E. coli JM109, aby vznikl transformant. Získaný transformant byl kultivován ve 2 ml média 2xYT, obsahujícího 50  $\mu$ g/ml ampicilínu. Z buněčné frakce kultivačního média byl plazmid vyčištěn pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Každý z vyčištěných plazmidů byl štěpen ve 20  $\mu$ l reakčního roztoku, obsahujícího 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, a buď 8 jednotek ApaI (Takara Shuzo Co., Ltd.) nebo 2 jednotky ApaLI (Takara Shuzo Co., Ltd.), při



teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Bylo očekáváno, že pokud budou fragmenty ligovány správně, touto štěpící reakcí by vznikl fragment dlouhý 7304 párů bází (v případě štěpení pomocí ApaI) nebo fragmenty dlouhé 5560, 1246 a 498 párů bází (v případě štěpení pomocí ApaLI) pro m1-hm2, a fragmenty dlouhé 6538 a 766 párů bází (v případě štěpení pomocí ApaI) nebo fragmenty dlouhé 3535, 2025, 1246 a 498 párů bází (v případě štěpení pomocí ApaLI) pro hm1-m2. Na základě tohoto očekávání byly plazmidy určovány. Jako výsledek byl získán expresní vektor kódující L řetězec hybridní protilátky lidská FR1/myší FR2,3,4 (označený „hmmMBC1L( $\lambda$ )/neo“) a expresní vektor kódující L řetězec hybridní protilátky myší FR1/lidská FR2/myší FR3,4 (označený „mhmMBC1L( $\lambda$ )/neo“).

#### (4) Konstrukce L řetězce zušlechtěné protilátky

L řetězec zušlechtěné protilátky #23-57-137-1 byl připraven technikou připojování CDR oblastí pomocí metody PCR. Pro přípravu L řetězce zušlechtěné protilátky #23-57-137-1 (verze „a“), která obsahuje FR1, FR2 a FR3 odvozené z lidské protilátky HSU 03 838 (GEN-BANK, Deftos, M. a kol., Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) a FR4 odvozenou z lidské protilátky S 25 755 (NBRF-PDB), bylo použito šest primerů.

Šest primerů bylo následujících: primery pro připojení CDR MBC1LGP1 (SEQ ID NO: 29) a MBC1LGP3 (SEQ ID NO: 30), oba obsahující pozitivní DNA sekvenci, primery pro připojení CDR MBC1LGP2 (SEQ ID NO: 31) a MBC1LGP4 (SEQ ID NO: 32), oba obsahují negativní DNA sekvenci, přičemž všechny obsahují na obou svých koncích komplementární sekvenci dlouhou 15 až 21 párů bází; a vnější primery: MBC1LVS1 (SEQ ID NO: 33) a MBC1LVR1 (SEQ ID NO: 34), které mají homologii k primerům pro připojení CDR MBC1LGP1, respektive MBC1LGP4.

Primery pro připojení CDR MBC1LGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4 byly odděleny na denaturačním polyakrylamidovém gelu s močovinou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), a extrahovány z něj pomocí rozdrcení a nasáknutí rozpouštědlem (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Každý z primerů pro připojení CDR (1 nmol každého) byl rozdělen na 6% denaturačním polyakrylamidovém gelu. Určení DNA fragmentu požadované délky bylo provedeno pomocí ozáření paprsky UV na tenké vrstvě gelu kysličníku křemičitého.

Požadovaný DNA fragment byl potom z něho izolován metodou rozdrčení a nasáknutí rozpouštědlem. Odebraný DNA fragment byl rozpuštěn v 20  $\mu$ l roztoku, který obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 1 mM EDTA.

Reakce PCR byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a připojeného pufru. PCR reakční roztok obsahoval (na 100  $\mu$ l) 1  $\mu$ l každého z výše uvedených primerů pro připojení CDR MBC1LGP1, MBC1HGP2, MBC1HGP3 a MBC1HGP4, 0,25 mM dNTP a 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq v pufru. PCR byla ponechána proběhnout 5 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 55 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty. K výsledné reakční směsi bylo přidáno 50 pmol každého z vnějších primerů MBC1LVS1 a MBC1LVR1. S touto reakční směsí byla PCR reakce ponechána proběhnout dalších 30 cyklů za stejných podmínek. S takto amplifikovaným fragmentem DNA byla provedena elektroforéza na gelu 3% Nu Sieve GTG agarózy (FMC Bio. Products).

Segment agarózy obsahující DNA fragment dlouhý 421 párů bází byl vyříznut a DNA fragment z něho byl vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Takto získaná PCR reakční směs byla použita pro klonování DNA fragmentu do plazmidu pUC19, který byl štěpen BamHI a HindIII. Výsledný plazmid byl sekvenován. Takto připravený plazmid byl označen „hMBCL/pUC19“. V tomto plazmidu však byla zaměněna aminokyselina na 104. pozici (odpovídající 96. aminokyselině podle Kabatova pravidla) v CDR zaměněna argininem. Pro opravu této aminokyseliny na tyrozin byl navržen a syntetizován opravný primer MBC1LGP10R (SEQ ID NO: 35). PCR reakce byla provedena za použití TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a připojeného pufru. PCR reakční roztok obsahoval (na 100  $\mu$ l) 0,6  $\mu$ g plazmidu hMBCL/pUC19 jako DNA matrici, 50 pmol každého z primerů MBC1LVS1 a MBC1LGP10R, 2,5 jednotky TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) a 0,25 mM dNTP v pufru, přes což byl převrstven minerální olej (50  $\mu$ l). PCR probíhala 30 cyklů za podmínek: 94 °C po dobu 1 minuty; 55 °C po dobu 1 minuty; a 72 °C po dobu 1 minuty. Takto amplifikovaný DNA fragment byl oddělen pomocí agarové gelové elektroforézy na gelu 3% Nu Sieve GTG agarose (FMC Bio. Products).

Segment agarózového gelu, který obsahoval fragment DNA dlouhý 421 párů bází byl vyříznut a DNA fragment byl z něho vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě. Takto připravená PCR reakční

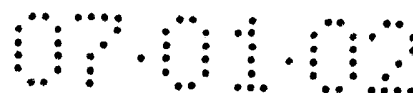
směs byla použita pro klonování DNA fragmentu do plazmidu pUC19, který byl štěpen restričními enzymy BamHI a HindIII.

Plazmid byl sekvenován pomocí primerů M13-M4 a M13-RV. Jako výsledek bylo potvrzeno, že plazmid měl správnou sekvenci. Plazmid byl potom štěpen restričními enzymy HindIII a BlnI, a DNA fragment dlouhý 416 párů bází byl oddělen pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. DNA fragment byl vyčištěn pomocí soupravy GENE CLEAN II Kit (BIO101) podle návodu přibaleného k soupravě, a potom vložen do plazmidu CMpUC19, který byl štěpen restričními enzymy HindIII a BlnI. Výsledný plazmid byl označen „hMBC1La $\lambda$ pUC19“. Tento plazmid byl štěpen EcoRI, aby byl získán DNA fragment, kódující zušlechtěný L řetězec. DNA fragment byl vložen do plazmidu pCOS1 tak, že iniciační kodon zušlechtěného L řetězce byl umístěn po směru vzhledem k promotoru EF1 $\alpha$ . Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1La $\lambda$ pCOS1“. DNA sekvence (včetně odpovídající aminokyselinové sekvence) zušlechtěného L řetězce verze „a“ je ukázána v SEQ ID NO: 66. Aminokyselinová sekvence verze „a“ je také uvedena v SEQ ID NO: 47.

Zušlechtěný L řetězec verze „b“ byl připraven pomocí mutagenese provedené metodou PCR. Verze „b“ byla navržena tak, že ve verzi „a“ byla aminokyselina glycin na 43. pozici (odpovídající 43. aminokyselině podle Kabatova pravidla) zaměněna za prolin a aminokyselina lyzin na 49. pozici (odpovídající 49. aminokyselině podle Kabatova pravidla) byla zaměněna za kyselinu asparagovou. PCR reakce byla provedena za použití plazmidu hMBC1La $\lambda$ pUC19 jako matrice, mutagenního primeru MBC1LGP5R (SEQ ID NO: 36) a primeru MBC1LVS1. Získaný DNA fragment byl štěpen BamHI a HindIII, a štěpený fragment byl klonován do BamHI-HindIII místa pUC19. Po sekvenování byl plazmid štěpen HindIII a AflII a výsledný štěpený fragment byl ligován do plazmidu hMBC1La $\lambda$ pUC19, který byl štěpen HindIII a AflII.

Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Lb $\lambda$ pUC19“. Tento plazmid byl štěpen EcoRI, aby byl získán DNA fragment, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný L řetězec. DNA fragment byl vložen do plazmidu pCOS1 tak, že iniciační kodon zušlechtěného L řetězce byl umístěn po směru vzhledem k promotoru EF1 $\alpha$ . Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Lb $\lambda$ pCOS1“.

Zušlechtěný L řetězec verze „c“ byl připraven pomocí mutagenese provedené metodou PCR. Verze „c“ byla navržena tak, že byla aminokyselina serin na 84. pozici (odpovídající 80. aminokyselině podle Kabatova pravidla) zaměněna za prolin. PCR



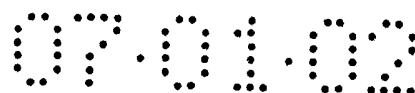
reakce byla provedena za použití plazmidu hMBC1La $\lambda$ pUC19 jako matrice, mutagenního primeru MBC1LGP6R (SEQ ID NO: 37) a primeru M13-RV. Získaný DNA fragment byl štěpen BamHI a HindIII, a klonován do pUC19, který byl štěpen BamHI a HindIII.

Po sekvenování byl plazmid štěpen BstPI a Aor51HI a výsledný štěpený fragment byl ligován do plazmidu hMBC1La $\lambda$ pUC19, který byl štěpen BstPI a Aor51HI. Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Lc $\lambda$ pUC19“. Tento plazmid byl štěpen EcoRI, aby byl získán DNA fragment, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný L řetězec. DNA fragment byl vložen do EcoRI místa plazmidu pCOS1 tak, že iniciační kodon zušlechtěného L řetězce byl umístěn po směru vzhledem k promotoru EF1 $\alpha$ . Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Lc $\lambda$ pCOS1“.

Zušlechtěné L řetězce verzí „d“, „e“ a „f“ byly také připraveny pomocí mutagenese provedené metodou PCR. Verze „d“, „e“ a „f“ byly navrženy tak, že ve verzích „a“, „b“, respektive „c“ byla aminokyselina tyrozin na 91. pozici (odpovídající 87. aminokyselině podle Kabatova pravidla) zaměněna za izoleucin. Pro každou z verzí „d“, „e“ a „f“ byla PCR reakce provedena za použití jednotlivých plazmidů hMBC1La $\lambda$ pCOS1 (pro verzi „d“), hMBC1Lb $\lambda$ pCOS1 (pro verzi „e“), respektive hMBC1Lc $\lambda$ pCOS1 (pro verzi „f“) jako matrice, mutagenního primeru MBC1LGP11R (SEQ ID NO: 38) a primeru M-S1 (SEQ ID NO: 44). Získaný DNA fragment byl štěpen BamHI a HindIII, a klonován do pUC19, který byl štěpen BamHI a HindIII. Po sekvenování byl plazmid štěpen HindIII a BlnI a výsledný štěpený fragment byl ligován do plazmidu C $\lambda$ pUC19, který byl štěpen HindIII a BlnI.

Takto získané plazmidy byly označeny „hMBC1Ld $\lambda$ pUC19“ (pro verzi „d“), „hMBC1Le $\lambda$ pUC19“ (pro verzi „e“) a „hMBC1Lf $\lambda$ pUC19“ (pro verzi „f“). Každý z těchto plazmidů byl štěpen EcoRI, aby byl získán DNA fragment, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný L řetězec. DNA fragment byl vložen do EcoRI místa plazmidu pCOS1 tak, že iniciační kodon zušlechtěného L řetězce byl umístěn po směru vzhledem k EF1 $\alpha$  promotoru v plazmidu. Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Ld $\lambda$ pCOS1“ (pro verzi „d“), „hMBC1Le $\lambda$ pCOS1“ (pro verzi „e“) a „hMBC1Lf $\lambda$ pCOS1“ (pro verzi „f“).

Zušlechtěné L řetězce verzí „g“ a „h“ byly také připraveny pomocí mutagenese provedené metodou PCR. Verze „g“ a „h“ byly navrženy tak, že ve verzích „a“ respektive „d“ byla aminokyselina histidin na 36. pozici (odpovídající 36. aminokyselině podle Kabatova pravidla) zaměněna za tyrozin. PCR reakce byla provedena za použití



mutagenního primeru MBC1LGP9R (SEQ ID NO: 39), primeru M13-RV a plazmidu hMBC1La $\lambda$ /pUC19 jako matrice. Další PCR byla provedena za použití takto získaného PCR produktu a proteinu M13-M4 a plazmidu hMBC1La $\lambda$ /pUC19 jako matrice. Získaný DNA fragment byl štěpen HindIII a BlnI, a potom klonován do plazmidu C $\lambda$ /pUC19, který byl štěpen HindIII a BlnI. Za použití tohoto plazmidu jako matrice, byla provedena PCR reakce za použití primerů MBC1LGP13R (SEQ ID NO: 40) a MBC1LVS1. Získaný DNA fragment byl štěpen ApaI a HindIII, a potom vložen buď do každého z plazmidů hMBC1La $\lambda$ /pUC19 a hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19, které byly štěpeny ApaI a HindIII. Získané plazmidy byly sekvenovány. Plazmidy u kterých bylo potvrzeno, že obsahují správnou sekvenci byly označeny „hMBC1Lg $\lambda$ /pUC19“ (pro verzi „g“) a hMBC1Lh $\lambda$ /pUC19 (pro verzi „h“). Každý z těchto plazmidů byl štěpen EcoRI, aby byl získán fragment obsahující DNA, která kóduje zušlechtěný L řetězec. DNA fragment byl vložen do EcoRI místa plazmidu pCOS1 tak, že iniciační kodon zušlechtěného L řetězce byl umístěn po směru vzhledem k EF1 $\alpha$  promotoru. Takto získané plazmidy byly označeny „hMBC1Lg $\lambda$ /pCOS1“ (pro verzi „g“) a „hMBC1Lh $\lambda$ /pCOS1“ (pro verzi „h“).

Zušlechtěné L řetězce verzí „i“, „j“, „k“, „l“, „m“, „n“ a „o“ byly také připraveny pomocí mutagenese provedené metodou PCR. PCR reakce byla provedena za použití plazmidu hMBC1La $\lambda$ /pUC19 jako matrice, mutagenního primeru MBC1LGP14S (SEQ ID NO: 41) a primeru V1RV( $\lambda$ ) (SEQ ID NO: 43). Výsledný DNA fragment byl štěpen ApaI a BlnI, a potom klonován do plazmidu hMBC1Lg $\lambda$ /pUC19, který byl štěpen ApaI a BlnI. Získané plazmidy byly sekvenovány a byl vybrán klon, do kterého byla vnesena mutace pro každou verzi. Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Lx $\lambda$ /pUC19“ (x=i, j, k, l, m, n nebo o). Tento plazmid byl štěpen EcoRI, aby byl získán fragment obsahující DNA, která kóduje zušlechtěný L řetězec. DNA fragment byl vložen do EcoRI místa plazmidu pCOS1 tak, že iniciační kodon zušlechtěného L řetězce byl umístěn po směru vzhledem k EF1 $\alpha$  promotoru. Takto získaný plazmid byl označen „hMBC1Lx $\lambda$ /pCOS1“ (x=i, j, k, l, m, n nebo o). DNA sekvence (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) verzí „j“, „l“, „m“, „n“ a „o“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 respektive SEQ ID NO: 70. Aminokyselinové sekvence těchto verzí jsou také uvedeny v SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 respektive SEQ ID NO: 51.

Zušlechtěné L řetězce verzí „p“, „q“, „r“, „s“ a „t“ navrženy tak, že ve verzích „i“, „j“, „m“, „l“ respektive „o“ byla aminokyselina histidin na 87. pozici (tyrozin) zaměněna

za izoleucin. Tyto verze byly připraveny za využití restričního místa Aor51MI v FR3 a zaměněním tohoto místa v každé z verzí „i“, „j“, „m“, „l“ nebo „o“ místem, které se nachází ve verzi „h“. Tedy restriční fragment Aor51HI (514 párů bází), obsahující CDR3, část FR3 a celou FR4, byl odstraněn z expresního plazmidu „hMBC1Lxλ/pCOS1“ (x=i, j, m, l nebo o). Na místo odstraněného fragmentu byl ligován restriční fragment Aor51HI (514 párů bází) z expresního plazmidu hMBC1Lhλ/pCOS1, který obsahuje CDR3, část FR3 a celou FR4 tak, že aminokyselina tyrozin na 91. pozici (odpovídající 87. aminokyselině podle Kabatova pravidla) byla zaměněna za izoleucin. Výsledný plazmid byly sekvenován. Od každé verze „i“, „j“, „m“, „l“ a „o“ byl izolován klon u kterého byla aminokyselina tyrozin na 91. pozici (odpovídající 87. aminokyselině podle Kabatova pravidla) byla zaměněna za izoleucin. Tyto modifikované verze plazmidů, odpovídající verzím „i“, „j“, „m“, „l“, respektive „o“ byly označeny jako verze „p“, „q“, „s“, „r“, respektive „t“. Získané plazmidy byly označeny hMBC1Lxλ/pCOS1 (x=p, q, s, r nebo t). DNA sekvence (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) verzí „q“, „r“, „s“, respektive „t“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 respektive SEQ ID NO: 74. Aminokyselinové sekvence těchto verzí jsou také uvedeny v SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 respektive SEQ ID NO: 55.

Plazmid hMBC1Lλ/pCOS1 byl štěpen HindIII a EcoRI a potom klonován do plazmidu pUC19, který byl štěpen HindIII a EcoRI. Takto získaný plazmid „hMBC1Lqλ/pUC19“.

Pozice zaměněných aminokyselin v jednotlivých verzích zušlechtěného L řetězce jsou uvedeny dále v tabulce 2.

Tabulka 2

Pozice zaměněné aminokyseliny v sekvenci  
(aminokyseliny jsou číslovány podle Kabatova pravidla)

Verze	36	43	45	47	49	80	87
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

V tabulce 2 představují velká písmena následující aminokyseliny: Y: tyrozin; P: prolin; K: lyzin; V: valin; D: kyselina asparagová; a I: izoleucin.

Kmeny *E. coli*, z nichž každý obsahuje plazmidy hMBC1HcDNA/pUC19 a hMBC1Lq/pUC19 byly označeny „*Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19)“, respektive „*Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq/pUC19)“, a byly uloženy za podmínek budapešťské smlouvy 15. srpna 1996 v Národním ústavu biologických věd a lidské technologie, Agentura průmyslové vědy a technologie, Japonsko (1-3, Higashi 1-chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonsko), pod přístupovými čísly FERM BP-5629 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) a FERM BP-5630 pro *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq/pUC19).

### (5) Transfekce buněk COS-7

Aby byla zhodnocena vazebná aktivita k antigenu a neutralizační aktivity hybridních protilátek a zušlechtěných protilátek #23-57-137-1, byly výše připravené expresní plazmidy přechodně exprimovány v buňkách COS-7. Pro přechodnou expresi L řetězce hybridních protilátek, byly buňky COS-7 současně transfekovány elektroporézováním pomocí zařízení Gene Pulser (Bio Rad) každou z následujících kombinací plazmidů: hMBC1HcDNA/pCOS1 a h/mMBC1L( $\lambda$ )/neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a m/hMBC1La $\lambda$ /neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a m/hMBC1Ld $\lambda$ /neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 a hmmMBC1L( $\lambda$ )/neo; a hMBC1HcDNA/pCOS1 a mhmMBC1L( $\lambda$ )/neo. Tedy, k suspenzi (0,8 ml) buněk COS-7 v PBS(-) ( $1 \times 10^7$  buněk/ml) byla přidána každá kombinace plazmidové DNA. Na výsledný roztok bylo působeno pulsy s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 25  $\mu$ F. Po 10 minutovém zotavovacím období při teplotě místnosti byly elektroporézované buňky suspendovány v médiu DMEM, obsahujícím 2% fetální telecí sérum s ultranízkým obsahem IgG (GIBCO), a potom kultivovány v 10 cm kultivačních miskách v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po kultivaci 72 hodin byl z kultur odebrán supernatant a centrifugován, aby z něho byly odstraněny buněčné zbytky. Takto připravený roztok byl použit jako vzorek pro test ELISA, popsáný dále.

Pro přechodnou expresi zušlechtěných protilátek #23-57-137-1 byly buňky COS-7 současně transfekovány elektroporézováním pomocí zařízení Gene Pulser (Bio Rad) každou plazmidy hMBC1HcDNA/pCOS1 a hMBC1Lx $\lambda$ /pCOS (x=a až t) stejným způsobem, jak bylo popsáno výše pro hybridní protilátky. Supernatanty z kultur byly zpracovány a použity v testu ELISA, popsáném dále.

Čištění hybridních protilátek a zušlechtěných protilátek ze supernatantů kultur buněk COS-7 bylo provedeno pomocí soupravy AffiGel Protein A MAPSII Kit (Bio Rad), podle návodu přibaleného k soupravě.

### (6) ELISA test

#### (i) Určování koncentrace protilátky

Destička testu ELISA pro určení koncentrace protilátky byla připravena následujícím způsobem. Každá z 96 jamek destičky testu ELISA (Maxisorp, NUNC) byla potažena 100  $\mu$ l potahovacího pufru (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,02% NaN<sub>3</sub>), doplněného 1  $\mu$ g/ml kozí protilátky proti lidskému IgG (TAGO) a potom blokována 200  $\mu$ l ředícího pufru [50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 1%

hovězí sérumalbumin (BSA); pH 7,2]. Ke každé jamce destičky byl přidán vzorek sériového ředění supernatantu z kultur buněk COS, v nichž byly jednotlivé hybridní protilátky a zušlechtěné protilátky exprimovány, nebo byl k jamce destičky přidán vzorek sériového ředění jednotlivých hybridních protilátek a zušlechtěných protilátek ve vyčištěné formě. Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a potom promyta PBS-Tween 20. Ke každé jamce destičky bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované a alkalickou fosfatázou (TAGO). Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a potom promyta PBS-Tween 20. Potom byl ke každé jamce destičky přidán roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). U roztoku v každé jamce byla měřena jeho absorpance při 405 nm pomocí odečítacího zařízení pro destičky Microplate Reader (Bio Rad), aby byla zjištěna koncentrace protilátky. Při tomto měření byl jako standardní látka použit čištěný Hu IgG1  $\lambda$  (The Binding Site).

#### (ii) Určování schopnosti vázat antigen

Destička testu ELISA pro určení schopnosti protilátky vázat antigen, byla připravena následujícím způsobem. Každá z 96 jamek destičky testu ELISA (Maxisorp, NUNC) byla potažena 100  $\mu$ l potahovacího pufru, obsahujícího 1  $\mu$ g/ml lidského PTHrP (1-34), a potom blokována 200  $\mu$ l ředícího pufru. Potom byl ke každé jamce destičky přidán vzorek sériového ředění supernatantu z kultur buněk COS-7, v nichž byly jednotlivé hybridní protilátky a zušlechtěné protilátky exprimovány, nebo byl k jamce destičky přidán vzorek sériového ředění jednotlivých hybridních protilátek a zušlechtěných protilátek ve vyčištěné formě. Potom byla destička inkubována při teplotě místnosti a promyta PBS-Tween 20. Ke každé jamce destičky bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované a alkalickou fosfatázou (TAGO). Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a potom promyta PBS-Tween 20. Potom byl ke každé jamce destičky přidán roztok 1 mg/ml substrátu („Sigma 104“, kyselina p-nitrofenylfosforečná, SIGMA). U roztoku v každé jamce byla měřena jeho absorpance při 405 nm pomocí odečítacího zařízení pro destičky Microplate Reader (Bio Rad).

#### (7) Potvrzení aktivity

##### (i) Hodnocení zušlechtěného H řetězce

Bylo zjištěno, že protilátky které obsahovaly jak zušlechtěnou verzi „a“ H řetězce tak chimerní L řetězec, vykazovaly stejnou úroveň vazebné aktivity pro PTHrP, jako má

chimerní protilátka. Tento výsledek naznačuje, že verze „a“ dosahuje zušlechtění V oblasti H řetězce v takovém stupni, který postačuje pro další hodnocení zušlechtění. Proto byla zušlechtěná verze „a“ H řetězce poskytnuta jakožto H řetězec zušlechtěné protilátky pro následující pokusy.

(ii) Aktivita hybridních protilátek

(ii-a) Hybridní protilátka FR1,2/FR3,4

Když byl jako L řetězec použit h/mMBC1L( $\lambda$ ), nebyla pozorována žádná vazebná aktivita k antigenu. Naopak, když byl jako L řetězec použit buď m/hMBC1La $\lambda$  nebo m/hMBC1Ld $\lambda$ , byla pozorována stejná úroveň vazebné aktivity k antigenu jako u chimerní protilátky #23-57-137-1 (Obr. 7). Tyto výsledky naznačují, že FR3 a FR4 nezpůsobují v zušlechtěných protilátkách žádný problém, zatímco FR1 a FR2 obsahují aminokyselinový zbytek (aminokyselinové zbytky), které potřebují být zaměněny.

(ii-b) Hybridní protilátka FR1/FR2

Když byl jako L řetězec použit mhmMBC1L( $\lambda$ ), nebyla pozorována žádná vazebná aktivita k antigenu. Naopak, když byl jako L řetězec použit hmmMBC1La( $\lambda$ ), byla pozorována stejná úroveň vazebné aktivity k antigenu jako u chimerní protilátky #23-57-137-1 (Obr. 8). Tyto výsledky naznačují, že FR1 nezpůsobuje v zušlechtěné protilátce žádný problém, zatímco FR2 obsahuje aminokyselinový zbytek (aminokyselinové zbytky), které potřebují být zaměněny.

(iii) Aktivita zušlechtěných protilátek

Byla zjišťována vazebná aktivita k antigenu u zušlechtěných protilátek, které jako L řetězec obsahují jeho verze „a“ až „t“. Výsledkem bylo zjištění, že zušlechtěné protilátky, které jako L řetězec obsahují jeho verze „j“, „l“, „m“, „o“, „q“, „r“, „s“ a „t“ vykazovaly stejnou vazebnou aktivitu k PTHrP, jakou vykazovala chimerní protilátka.

(8) Získání buněčné linie CHO schopné stabilní produkce protilátky

Aby byla získána buněčná linie schopná produkovat zušlechtěné protilátky stabilně, každý z výše připravených expresní plazmidy byl vnesen do buněk CHO (DXB11).

Tedy, získání buněčné linie schopné produkovat zušlechtěné protilátky stabilně, bylo provedeno za použití každé z následujících kombinací plazmidů jako expresních vektorů pro buňky CHO: hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lm $\lambda$ /pCOS1; hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lq $\lambda$ /pCOS1; a hMBC1HcDNA/pCHO1 a hMBC1Lr $\lambda$ /pCOS1.

Buňky CHO byly současně transfekovány plazmidy elektroporézováním pomocí zařízení Gene Pulser (Bio Rad). Potom byly expresní plazmidy odděleně štěpeny restriktivním enzymem PvuI, aby byly získány lineární fragmenty DNA. Výsledné DNA fragmenty byly extrahovány fenolem a chloroformem a potom sráženy ethanolem. Takto připravené fragmenty DNA byly použity pro následující elektroporaci. Tedy, fragment plazmidové DNA (10 µg každého) byl přidán k 0,8 ml suspenze buněk CHO v PBS(-) ( $1 \times 10^7$  buněk/ml). Na výsledný roztok bylo působeno pulsy s elektrostatickou kapacitou 1500 V a 25 µF. Po 10 minutovém zotavovacím období při teplotě místnosti byly elektroporézované buňky suspendovány v médiu MEM- $\alpha$  (GIBCO), obsahujícím 10% fetální telecí sérum (GIBCO) a potom kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru za použití destiček s 96 jamkami (Falcon). Jeden den po tom, co byla kultivace započata, bylo médium zaměněno za selekční médium MEM- $\alpha$  bez ribonukleozidů nebo deoxyribonukleozidů, obsahující 10% fetální telecí sérum (GIBCO) a 500 mg/ml Geneticinu (síran G418; GIBCO). Z kultivačního média byly vybírány buňky, do kterých byl vnesen gen protilátky. Kultivační médium je zaměněno za čerstvé. Dva týdny po výměně média byly buňky pozorovány pod mikroskopem. Když byl pozorován uspokojivý růst buněk, bylo určováno množství produkovaných protilátek běžným ELISA testem pro určování koncentrace protilátek, který byl popsán výše. Z buněk byly vybrány ty, které produkovaly větší množství protilátek.

Potom byl rozsah kultivace získané buněčné linie, schopné stabilní produkce protilátek, zvětšen použitím láhví v roleru, za použití média MEM- $\alpha$  bez ribonukleozidů nebo deoxyribonukleozidů, obsahujícího 2% fetální telecí sérum s ultranízkým obsahem IgG. Třetí a čtvrtý den kultivace byl supernatant z kultur odebrán a filtrován na 0,2 µm filtru (Millipore), aby z něho byly odstraněny zbytky buněk. Čištění zušlechtěných protilátek ze supernatantu kultur buněk CHO bylo provedeno pomocí sloupce POROS s proteinem A (PerSeptive Biosystems) na zařízení ConSep LC100 (Millipore), podle návodu přibaleného k soupravě. Zušlechtěné protilátky byly použity jako vzorky pro určování neutralizační aktivity a pro testování farmakologické účinnosti na zvířecích modelech hyperkalcinémie. Koncentrace a vazebná aktivita k antigenu byla u čištěných zušlechtěných protilátek určována pomocí stejného ELISA systému, který byl popsán výše.

Referenční příklad 5: Zjišťování neutralizační aktivity

Zjišťování neutralizační aktivity myších protilátek, chimerních protilátek a zušlechtěných protilátek bylo provedeno pomocí buněčné linie krysích myelomových buněk ROS18/2.8-5. Buňky ROS18/2.8-5 byly kultivovány v médiu Ham'S F-12 (GIBCO) obsahujícím 10% fetální telecí sérum (GIBCO) v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Buňky ROS18/2.8-5 byly vysety do každé jamky destičky s 96 jamkami v hustotě 10<sup>4</sup> buněk/100 µl/jamku a kultivovány po dobu 1 dne. Potom co byla kultivace ukončena, bylo kultivační médium zaměněno za médium Ham'S F-12, obsahující 4 mM hydrokortizonu a 10% fetálního telecího séra. Po kultivaci tři až čtyři dny byly kultivované buňky promyty 260 µl média Ham'S F-12 (GIBCO), a potom bylo přidáno 80 µl média Ham'S F-12, obsahujícího 1 mM isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, SIGMA), 10% fetální telecí sérum a 10 mM HEPES. Výsledná směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

Média z buněčných kultur, která obsahují myší protilátky, chimerní protilátky a zušlechtěné protilátky, u kterých má být testována neutralizační aktivita, byla napřed sériově naředěna v následujících ředících sériích: [10 µg/ml, 3,3 µg/ml, 1,1 µg/ml a 0,37 µg/ml], [10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,5 µg/ml a 0,01 µg/ml] a [10 µg/ml, 5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml a 0,31 µg/ml]. Každý vzorek roztoku naředěných protilátek byl smíchán s ekvivalentním množstvím 4 mg/ml PTHrP (1-34). Výsledný smíšený roztok (80 µl) byl přidán do každé jamky. V každé jamce se konečná koncentrace každé protilátky stala čtvrtinová vzhledem k výše zmíněné koncentraci protilátky a v soulase s tím se koncentrace PTHrP (1-34) stala 1 mg/ml. Po působení při teplotě místnosti po dobu 10 minut byl supernatant buněčné kultury odebrán a zbytek byl 3x promyt PBS. Potom byl z buněk extrahován cAMP pomocí 100 µl směsi 0,3% HCl-95% ethanol a poté byla směs HCl-ethanol odpařena pomocí vodní vývěvy. Zbytek byl rozpuštěn ve 120 µl pufru EIA, který je součástí soupravy cAMP EIA Kit (CAYMAN CHEMICAL'S), aby z něho byl cAMP extrahován. Množství cAMP bylo určeno pomocí soupravy cAMP EIA Kit (CAYMAN CHEMICAL'S), podle návodu přibaleného k soupravě. Výsledkem bylo zjištění, že mezi zušlechtěnými protilátkami, které mají tutéž úroveň vazebné aktivity k antigenu jako chimerní protilátka, ty které obsahují L řetězce verzí „q“, „r“, „s“ a „t“ (v nichž byla aminokyselina tyrozin 91. na pozici zaměněna za izoleucin), vykazovaly podobnou neutralizační aktivitu jako chimerní protilátka, a že protilátka obsahující L řetězec verze „q“ vykazovala nejsilnější neutralizační aktivitu.

## Seznam sekvencí – otevřený text

- SEQ ID NO: 1 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 2 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 3 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 4 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 5 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 6 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 7 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 8 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 9 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 10 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 11 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 12 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 13 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 14 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 15 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 16 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 17 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 18 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 19 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 20 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 21 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 22 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 23 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 24 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 25 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 26 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 27 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 28 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 29 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 30 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 31 Syntetizovaná DNA
- SEQ ID NO: 32 Syntetizovaná DNA

SEQ ID NO: 33 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 34 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 35 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 36 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 37 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 38 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 39 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 40 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 41 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 42 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 43 Syntetizovaná DNA  
SEQ ID NO: 44 Syntetizovaná DNA

#### Průmyslová využitelnost

Předložený vynález poskytuje terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii odolnou k lékům, které obsahuje jako svou aktivní složku látku schopnou inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem.

Na základě skutečnosti, že po podání látky bylo pozorováno zlepšení hladiny vápníku v krvi a tělesné hmotnosti na zvířecím modelu hyperkalcinémie odolné k lékům, bylo zjištěno, že látka je užitečná jako terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii odolnou k lékům.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii odolnou k lékům, vyznačující se tím, že obsahuje jako svou aktivní složku látku schopnou inhibovat vazbu mezi proteinem podobným hormonu příštítných tělísek (PTHrP) a jeho receptorem.
2. Terapeutické činidlo podle nároku 1, vyznačující se tím, že hyperkalcinémie odolná k lékům je odolná proti terapeutickému činidlu pro hyperkalcinémii, jinému než je látka schopná inhibovat vazbu mezi PTHrP a jeho receptorem.
3. Terapeutické činidlo podle nároků 1 nebo 2, vyznačující se tím, že terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii je činidlo inhibující vstřebávání kostní tkáně, činidlo zvyšující vylučování vápníku, činidlo inhibující střevní vstřebávání vápníku nebo močopudné činidlo.
4. Terapeutické činidlo podle nároků 1 nebo 2, vyznačující se tím, že terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii je činidlo inhibující vstřebávání kostní tkáně.
5. Terapeutické činidlo podle nároku 4, vyznačující se tím, že činidlo inhibující vstřebávání kostní tkáně je bifosfonát nebo kalcitonin.
6. Terapeutické činidlo podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že látkou je agonista PTHrP receptoru.
7. Terapeutické činidlo podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že látkou je protilátka proti PTHrP.
8. Terapeutické činidlo podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že látkou je fragment protilátky proti PTHrP a/nebo modifikovaná forma fragmentu.

9. Terapeutické činidlo podle nároku 7, vyznačující se tím, že protilátka je monoklonální.
10. Terapeutické činidlo podle nároku 7, vyznačující se tím, že protilátka je lidská protilátka nebo zušlechtěná nebo chimerní protilátka.
11. Terapeutické činidlo podle nároku 7, vyznačující se tím, že protilátka je v zušlechtěné formě.
12. Terapeutické činidlo podle nároku 11, vyznačující se tím, že zušlechtěná protilátka je zušlechtěná protilátka #23-57-137-1.

Terapeutické činidlo podle kteréhokoli z nároků 1 až 12, vyznačující se tím, že hyperkalcinémie odolná k lékům je způsobena rakovinou.

## SEZNAM SEKVENCÍ

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Terapeutické činidlo pro hyperkalcinémii

<130> PH-946-PCT

<150> JP 11-192270

<151> 1999-07-06

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 1

aaatagccct igaccaggca

20

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 2

ctggttcggc ccacctctga aggttcaga atcgaatg 38

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 3

ggaatccggg ccagtgata gacagatg 28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 4

ggaatccggg tcagrngaag gtggraaca 29

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 5

gtttccag tcacgac

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 6

cagaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 7

gtctaagcct ccacatgaa acttcgggct c

31

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 8

tgttggatcc ctgcagagac agtgaccaga

30

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 9

gtctgaattc aagcttcac catggggttt ggctg

36

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 10

tttcccgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgacca g

41

<210> 11

<211> 109

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 11

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa ccccacggtc accctgttcc 60

cgccctctc ttaggagctc caagccaaca aggccacct agtgtgtct

109

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 12

ggtttggtgg tctccactcc cgccttgacg ggctgcat ctgcctcca ggccactgtc 60  
acagctcccg ggtagaagtc actgatcaga cacactagtg tggccttggt 110

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 13

ggagtggaga ccaccaaacc ctcaaacag agcaacaaca agtacgaggc cagcagctac 60  
ctgagcctga cgcccagca gtggaagtcc cacagaag 98

<210> 14

<211> 106

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 14

tgttgaattc ttactatgaa cattctgtag gggccactgt ctctccacg gtgtccctt 60  
catgcgtgac ctggcagctg tagcttctgt gggacttcca ctgctc 106

<210> 15

<211> 43

07.01.02

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 15

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa ccc

43

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 16

tgttgaattc ttactatgaa

20

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 17

caacaagtac gcgccagca gctacctgag cctgacgcc

39

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 18

gtagctgctg gccgctact tgtgtgtgct ctgtttgga

39

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 19

gtctgaattc aagcttagtc ctaggtcgaa ctgtggctgc accatc

46

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 20

tgttgaattc ttactaacac ictcccctgt tga

34

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 21

gtctaagctt ccacatggc ctggactcct ctctt

35

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 22

tgttgaattc agatctaact acttacctag gacagtgacc ttggtccc

48

<210> 23

<211> 128

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 23

gtctaagctt ccacatggg gtttgggctg agctggggtt tcctcgttgc tctttaaga 60  
ggtgtccagt gtcagtgca gctggtggag tctgggggag gcgtggtcca gcctgggagg 120  
tccctgag 128

<210> 24

<211> 125

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 24

accattagta gtggtgtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaagg gcgattcacc 60  
atctccagag acaattcaa gaacacgctg tatctgcaa tgaacagcct gagagctgag 120  
gacac 125

<210> 25

<211> 132

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

07.01.03

2001-4730

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 25

ctaccaccac tactaatggt tgccaccac tccagcccct tgcctggagc ctggcggacc 60  
caagacatgc catagtact gaaggtgaat ccagaggctg cacaggagag tctcaggac 120  
ctcccaggct gg 132

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 26

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc cccagtaagc aaagtaagtc 60  
atagtagtct gtctgcaca gtaatacaca gccgtgtcct cagctctcag 110

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 27

gtctaagctt ccacatggg gttgggctg

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 28

tgttgatcc ctgaggagac ggtgaccagg

30

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 29

acaaagcttc caccatggcc tggactctc tcttctctt cttgttctt cattgctcag 60

gttcttctc ccagcttgtg ctgactcaat cgcctctgc ctctgctcc ctgggagcct 120

cggtaagct cac

133

<210> 30

<211> 118

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 30

agcaagatgg aagccacagc acaggtgatg ggattcctga tcgcttctca ggctccagct 60  
ctggggctga gcgctaccic accatctcca gcctccagtc tgaggatgag gctgacta 118

<210> 31

<211> 128

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 31

ctgtgcttc catcttgctt aagtttcatc aagtaccgag ggcccttctc tggctgctgc 60  
tgatgccatt caatggtgta cgtactgtgc tgactactca aggtgcaggt gagcttgacc 120  
gaggctcc 128

<210> 32

<211> 114

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 32

cttggatccg ggctgacctt ggacggtcag ttggtcctt ccgccgaaca ccctcacaaa 60  
 ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gtaatagtca gcctcatcct caga 114

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 33

acaaagcttc caccatg 17

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 34

cttggatccg ggctgacct 19

<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 35

cttggatcgg ggctgacctt ggacggtcag ttggtcctt ccgccgaaca cgtacacaaa 60

ttgttcctta attgt 75

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 36

aaaggatcct taagatccat caagtaccga gggggcttct ctg 43

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 37

acaaagctta gcgtacctc accatctcca gcctccagcc tgagga 46

<210> 38

<211> 111

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 38

cttggatccg ggctgacctt ggacggtcag ttggtcctt ccgccgaaca cgtacacaaa 60  
 ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gatatagtca gccicatcct c 111

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 39

cttctctggc igctgctgat accattcaat ggtgtacgta ct 42

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 40

cgagggcctt tctctggctg ctgctg

26

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 41

gagaagggcc ctargtacst gatgrawctt aagca

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 42

0001-4730

07.01.02

cacgaattca ctatcgattc tggaaccitc agagg

35

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 43

ggcttggagc tcctcaga

18

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetická DNA

<400> 44

gacagtggtt caaagttttt

20

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

07.01.02

0001-4730

<400> 45

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser

65 70 75 80

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val





07.0100

2001-4730

<210> 49  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
20 25 30  
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met  
35 40 45  
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80  
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp  
85 90 95  
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
100 105 110  
Thr Val Leu Gly Gln Pro  
115

<210> 50  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
                   20                    25                    30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met  
                   35                    40                    45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
                   50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp  
                   85                    90                    95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
                   100                    105                    110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
                   115

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
                   20                    25                    30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met

35	40	45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp		
85	90	95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		
100	105	110
Thr Val Leu Gly Gln Pro		
115		

- <210> 52
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 52		
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr		
20	25	30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met		
35	40	45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp		

2001-4730

07.0100

85 90 95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 115

<210> 53  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 53  
 Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met  
 35 40 45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp  
 85 90 95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 115

<210> 54  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
                   20                    25                    30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met  
                   35                    40                    45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
                   50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp  
                   85                    90                    95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
                   100                    105                    110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 115

<210> 55  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
                   20                    25                    30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met  
                   35                    40                    45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
                   50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp  
                   85                    90                    95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
                   100                    105                    110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 115

- <210> 56
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

07.01.00

2001-4730

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 57

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 57

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

-15 -10 -5

gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96

2007-4730

07.01.00

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys  
-1 1 5 10  
cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144  
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
15 20 25  
agt agc tat ggc atg tct tgg att cgc cag act cca gac aag agg ctg 192  
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
30 35 40 45  
gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240  
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
50 55 60  
gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac 288  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
65 70 75  
acc cta tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg 336  
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met  
80 85 90  
ttt tac tgt gca aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384  
Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly  
95 100 105  
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
110 115

<210> 58

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 58

atg ggg ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

-15                      -10                      -5

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

-1    1                      5                      10

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15                      20                      25

agt agc tat ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192

Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30                      35                      40                      45

gag tgg gtg gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro

50                      55                      60

gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

65                      70                      75

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg 336

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

2001-4730

07.01.02

80 85 90  
tat tac tgt gcg aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly

95 100 105

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

2001-4730

07.01.00

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 65

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 65

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

                  -15                    -10                    -5

tct ttc tcc caa ctt gtg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser

          -1    1                    5                    10

ctg gga gcc tca gca aaa ctc acg tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

          15                    20                    25

acg tac acc att gaa tgg tat cag caa cag cca ctc aag cct cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys

30	35	40	45	
tat gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg				240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly				
	50	55	60	
att cct gat cgc ttc tct gga tcc agc tct ggt gct gat cgc tac ctt				288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu				
	65	70	75	
agc att tcc aac atc cag cca gaa gat gaa gca atg tac atc tgt ggt				336
Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly				
	80	85	90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tat gtt ttc ggc ggt ggg				384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly				
	95	100	105	
acc aag gtc act gtc cta ggt cag ccc				411
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro				
110		115		

<210> 66

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)





50	55	60	
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc			288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu			
65	70	75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt			336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly			
80	85	90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg			384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly			
95	100	105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc			411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro			
110	115		

<210> 68  
 <211> 411  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(411)

<220>  
 <221> zralý peptid  
 <222> (58)..(411)

<400> 68  
 atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly  
                           -15                          -10                          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tog ccc tct gcc tct gcc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser  
           -1  1                          5                          10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
           15                          20                          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys  
           30                          35                          40                          45

tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
                           50                          55                          60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
           65                          70                          75

acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly  
           80                          85                          90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384

Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
           95                          100                          105

acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110                          115

<210> 69  
 <211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 69

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
      -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1          5          10

ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
      30          35          40          45

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
      50          55          60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

```



Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser  
 -1 1 5 10  
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144  
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
 15 20 25  
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192  
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 30 35 40 45  
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
 50 55 60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
 65 70 75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly  
 80 85 90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

- <210> 71
- <211> 411
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens





07.01.02

2001-4730

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
15 20 25  
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192  
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
30 35 40 45  
tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
50 55 60  
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
65 70 75  
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336  
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly  
80 85 90  
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
95 100 105  
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
110 115

<210> 73

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

07.01.02

2004-4730

<220>

<221> zralý peptid

<222> (58)..(411)

<400> 73

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48  
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly  
-15 -10 -5  
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96  
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser  
-1 1 5 10  
ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144  
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
15 20 25  
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192  
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys  
30 35 40 45  
tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
50 55 60  
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
65 70 75  
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336  
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly  
80 85 90  
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly



07.01.00

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 30 35 40 45  
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
 50 55 60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
 65 70 75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly  
 80 85 90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

<210> 75

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
 20 25 30  
 Thr Ala

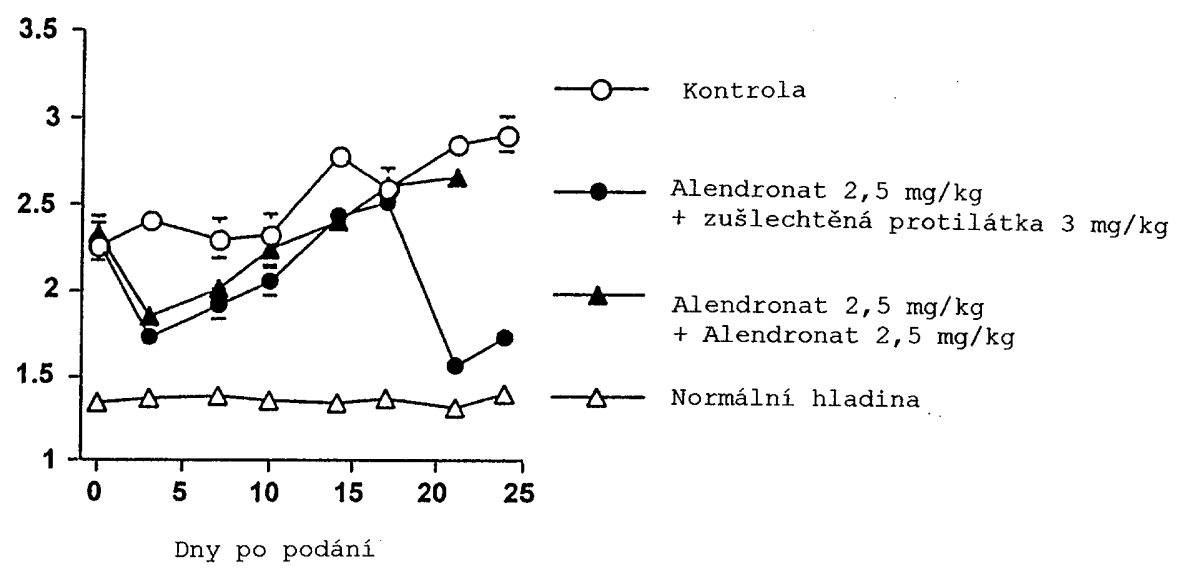
2001-4730

07.01.02

1/4

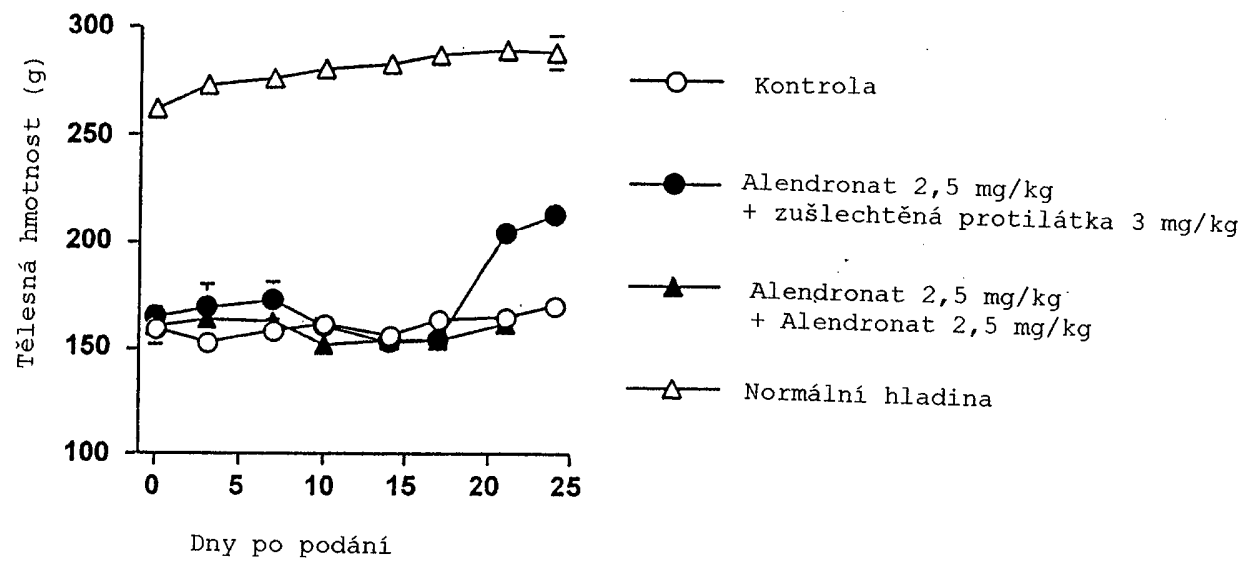
Obrázek 1

Hladina ionizovaného vápníku v krvi (mmol/l)



2/4

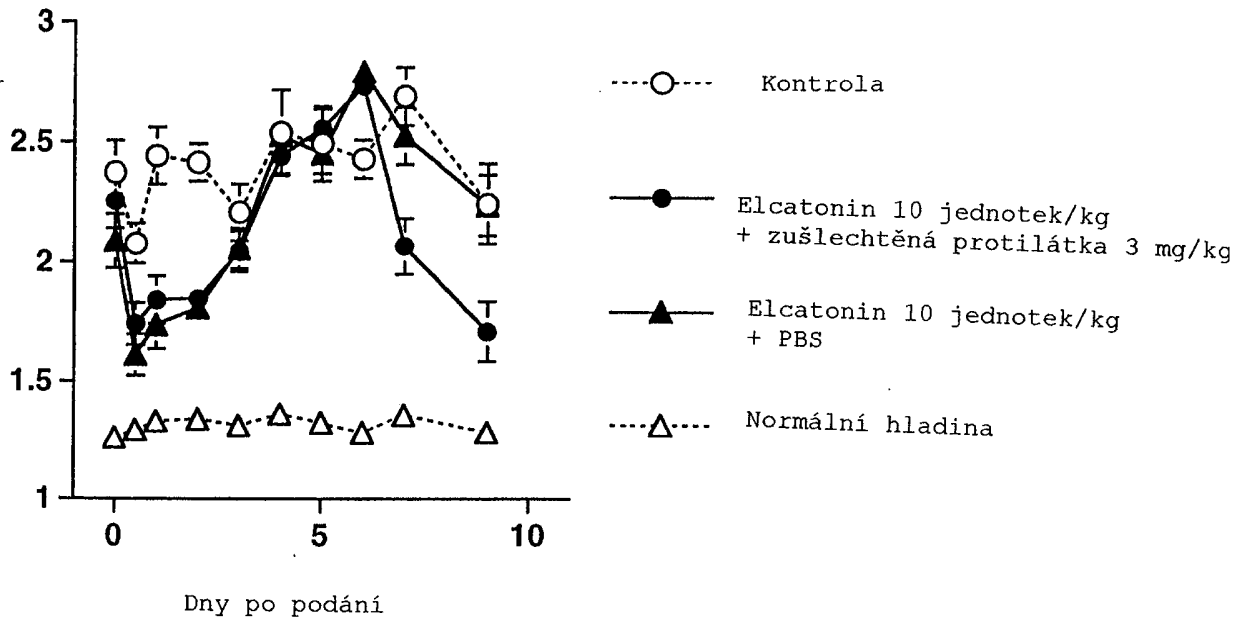
Obrázek 2



3/4

Obrázek 3

Hladina ionizovaného vápníku v krvi (mmol/l)



4/4

Obrázek 4

