

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.04.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.04.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/84**
(33) Země priority: **CU**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č. 7/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/CU2002/000003**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/081496**

(21) Číslo dokumentu:

2003-2668

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. :
C 07 K 16/30
C 07 K 16/42
C 12 N 5/20
A 61 K 31/7032
A 61 K 31/395

(71) Přihlašovatel:
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, Ciudad
Habana, CU

(72) Původce:
Mateo De Acosta Del Río Cristina María, Ciudad de la
Habana, CU
Lombardero Valladares Josefa, Ciudad de la Habana, CU
Roque Navarro Lourdes Tatiana, Ciudad de la Habana,
CU
López Requena Alejandro, Ciudad de la Habana, CU

(74) Zástupce:
Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1,
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Rekombinantní protilátky související s
gangliosidy a jejich použití při diagnóze a léčbě
nádorů**

(57) Anotace:
Popisuje se získání modifikovaných protilátek pomocí
technologie rekombinantní DNA z myši monoklonální
protilátky P3 (MAb P3) produkované buněčnou linií
hybridomu uloženou podle smlouvy z Budapešti pod
přístupovým číslem ECACC 94113026 a z její anti-idiotypové
myši monoklonální protilátky 1E10 (MAb 1E10)
produkované buněčnou linií hybridomu s depozitním číslem
ECACC 97112901, s cílem vytvoření monoklonálních
protilátek, které si zachovávají biologickou funkci specifické
vazby na antigen původních protilátek, ale současně jsou méně
imunogenní. Chimerní protilátky obsahují variabilní domény
myšního imunoglobulinu a konstantní domény lidského
imunoglobulinu. Vedle toho, že tyto humanizované protilátky
obsahují konstantní domény lidských imunoglobulinů, jsou
modifikovány v oblasti myších základních zbytků (FR) a
zejména v těch zónách, které by mohly být v antigenním místě
pro T buňky, a tak několik pozic FR je rovněž humánních,
Tyto protilátky lze použít při diagnóze a léčbě rozličných typů
nádorů, jakož i pro terapeutické a diagnostické účely.

CZ 2003 - 2668 A3

15.04.04

REKOMBINANTNÍ PROTILÁTKY SOUVISEJÍCÍ S GANGLIOSIDY A JEJICH POUŽITÍ PŘI DIAGNÓZE A LÉČBĚ NÁDORŮ

Oblast techniky

Předložený vynález se týká oblasti biotechnologie, zejména nových rekombinantních protilátek získaných prostřednictvím genového inženýrství, konkrétně chimerních a humanizovaných protilátek získaných z myši monoklonální protilátky P3 (MAb P3) a její antiidiotypové myši monoklonální protilátky 1E10 (MAb 1E10).

Konkrétněji se vynález týká protilátek, které se vážou na gangliosidy obsahující *N*-glykolylovou kyselinu sialovou, ale nikoli s acetylátovanými formami gangliosidů ani s neutrálními glykolipidy. Gangliosidy obsahující *N*-glykolylovou kyselinu sialovou jsou antigeny hojně exprimované při rakovině prsu a melanomech. Na druhé straně se na experimentálních modelech prokázal protinádorový účinek MAb 1E10.

Předložený vynález se také týká farmaceutických kompozic, které obsahují dříve popsané rekombinantní protilátky prospěšné při diagnóze a léčbě rakoviny, zejména rakoviny prsu a melanomů.

Dosavadní stav techniky

Gangliosidy jsou glykosfingolipidy, které obsahují kyselinu sialovou a jsou přítomné v plasmatické membráně buněk obratlovců (Stults a spol. (1989): Glycosphingolipids: structure, biological source and properties, *Methods Enzymology*, 179: 167-214). O některých z těchto molekul se v literatuře referovalo jako o antigenech souvisejících s nádory nebo markery nádoru (Hakomori a spol. (1991): Possible functions of tumor associated

carbohydrate antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 3: 646-653), a proto se použití protilátek proti gangliosidům popisovalo jako prospěšné při diagnóze a léčbě rakoviny (Houghton a spol. (1985): Mouse monoclonal antibody IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: to phase I trial in patients with malignant melanoma, *PNAS USA*, 82: 1242-1246; Zhang a spol. (1997): Selection of carbohydrate tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry. I. Focus on gangliosides, *Int. J. Cancer*, 73: 42-49).

Kyseliny sialové častěji exprimované u zvířat jsou N-acetyl (NeuAc) a N-glykoly (NeuGc) (Corfield a spol. (1982): Occurrence of sialic acids, *Cell. Biol. Monogr.*, 10: 5-50). Obecně se NeuGc neexprimuje v normálních lidských a kuřecích tkáních, ale všeobecně se vyskytuje u jiných obratlovců (Leeden a Yu, (1976): Chemistry and analysis of sialic acid. In: *Biological Role of Sialic Acid*. Rosenberg A. a Shengtrund C. L. (editoři). Plenum Press, New York, 1-48; Kawai a spol. (1991): Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry, *Cancer Research*, 51: 1242-1246). Nicméně existují studie, které ukazují, že protilátky proti NeuGc rozpoznávají určité lidské nádory a nádorové buněčné linie (Higashi a spol. (1988): Detection of gangliosides as N-glycolylneuraminic acid specific tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human retinoblastoma cells, *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 952-956; Fukui a spol. (1989): Detection of glycoproteins as tumor associated Hanganutziu-Deicher antigen in human gastric cancer cell line, NUGC4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 1149-1154). Zvýšené koncentrace GM3 (NeuGc) gangliosidů byly nalezené v lidské rakovině prsu (Marquina a spol. (1996): Gangliosides expressed in human breast cancer, *Cancer Research*, 56: 5165-5171), tento výsledek činí použití

této molekuly jako terče pro léčbu rakoviny přitažlivým.

Monoklonální protilátka (MAb) P3 produkovaná buněčnou linií uloženou pod přístupovým číslem ECACC 94113026 (Evropský patent EP 0 657 471 B1) je myší monoklonální protilátka s IgM isotypem, která se získá, když se spojí myší splenocyty z myši BALB/c imunizované liposomy obsahujícími GM3 (NeuGc) a tetanový toxoid s buněčnou linií P3-X63-Ag8.653; která je myším myelomem. Tato protilátka MAb P3 výrazně reaguje s gangliosidy obsahujícími N-glykoly sialovou kyselinu, ale nereaguje s acetylovými formami gangliosidů ani s neutrálními glykolipidy. Pomocí imunocytochemických a imunohistochemických studií provedených s buněčnými liniemi a tkáněmi z benigních a neoplastických nádorů se prokázalo, že MAb P3 rozpoznává rakovinu prsu (Vázquez a spol. (1995): Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids, *Hybridoma*, 14: 551-556) a melanom.

Monoklonální protilátka MAb P3 indukovala antiidiotypovou imunitní odpověď (Ab2) u myši BALB/c (syngenetický model), dokonce i bez adjuvans a proteinového nosiče, (Vázquez a spol. (1998): Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody, *Hybridoma*, 17: 527-534). Úloha elektronegativních skupin, sialové kyseliny (pro gangliosidy) a SO_3^- (pro sulfatidy - sulfogalaktosylceramidy), v rozpoznávacích vlastnostech této protilátky byla navržena pomocí imunochemických analýz (Moreno a spol. (1998): Delineation of epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides, *Glycobiology*, 8: 695-705).

Antiidiotypový MAb 1E10 (MAb 1E10) subtypu IgG1 se získal z myši BALB/c imunizované s MAb P3 vázaným na KLH (US patent

6,063,379, buněčná linie uložená pod přístupovým číslem ECACC 97112901). MAbai 1E10 rozpoznávala MAb P3 a nevázala jiné protilátky IgM proti gangliosidům. Kromě toho MAbai 1E10 inhibovala specifickou vazbu MAb P3 na GM3 (NeuGc) a na buněčnou linii MDA-MB-435 získanou z karcinomu prsních kanálků (pozitivních na vazbu MAb P3). MAbai 1E10 stimulovala silnou imunitní odpověď protilátek Ab3, když se imunizovaly myši ze syngenetických a alogenních modelů, přičemž tyto protilátky Ab3 nevykazovaly stejnou specifitu jako MAb P3, i když nesly idiotypy podobné těm, které nesla protilátka Ab1 (Vázquez a spol. (1998): Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody, *Hybridoma*, 17: 527-534). MAbai 1E10 stimulovala silný protinádorový účinek u syngenetické, jakož i alogenní myši. Růst buněčné linie karcinomu prsních žláz F3II se významně snížil opakovanou dávkou MAbai 1E10 vázanou na KLH ve Freundově adjuvanci, když se myš BALB/c vakcinovala. Po vakcinaci se také snížil počet spontánních plicních metastáz. Intravenózní aplikace MAbai 1E10 naočkované myši C57BL/6, 10 až 14 dní po intravenózním naočkování melanomových buněk B16, způsobilo dramatické snížení počtu plicních metastáz při srovnání s myši ošetřenou irelevantním IgG. Tyto výsledky naznačují, že se spouští více než jeden mechanismus protinádorového účinku (Vázquez a spol. (2000): Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides, *Oncol. Rep.*, 7: 751-756).

I když se hybridomová technologie během 15 let rozvinula (Kohler a Milstein (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256: 495-497), a kdy monoklonální protilátky jsou stále velice prospěšné při diagnózách, jakož i ve výzkumu, neprokázala se jejich terapeutická účinnost u lidí. Způsobuje to hlavně jejich krátký poločas života v krvi a to, že myši efektorové funkce selhávají

pro lidský imunitní systém a také kvůli lidské imunitní odpovědi na myší protilátky (HAMA odpověď).

Převrat v eventuální užitečnosti MAb jinak způsobila technologie genového inženýrství, jelikož manipulací genů imunoglobulinů je možné získat modifikované protilátky se sníženou antigenitou a rovněž zlepšit efektorové funkce pro léčbu nebo diagnózy určitých patologií. Způsoby snížení imunogenity imunoglobulinu mají zásadní cíl zmenšit rozdíly mezi myší protilátkou a lidským imunoglobulinem, aniž by se změnila specifita rozpoznávání antigenu (Morrison a Oi (1989): *Genetically engineered antibody molecules, Adv. Immunol.*, 44: 65-92).

V poslední době bylo vyvinuto několik způsobů humanizace myších nebo krysích protilátek, a tím snížení xenogenní imunitní odpovědi proti cizím proteinům, když jsou vpíchnuté lidem. Jedním z prvních přístupů ke snížení antigenity byly chimerní protilátky, ve kterých se variabilní domény myšího proteinu vložily do konstantních domén lidských molekul, které vykazují stejnou specifitu, ale sníženou imunogenitu ve srovnání s jejich myšími protějšky, přičemž se zachovaly humánní efektorové funkce chimerních protilátek, (Morrison a spol. (1984): *Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains, PNAS USA*, 81: 6851-6855). I když chimerní protilátky mají stejnou specifitu jako myší protějšky, běžně se pozorovala imunitní odpověď na hlodavčí variabilní oblasti.

Při pokusu o další snížení imunogenity chimerních protilátek, se transplantovaly pouze oblasti determinující komplementaritu (CDR) z hlodavčí monoklonální protilátky do oblastí lidských základních zbytků a tato hybridní variabilní oblast se exprimovala s lidskými konstantními oblastmi (Jones a

spol. (1986): Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature*, 321: 522-524; Verhoeyen a spol. (1988): Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity, *Science*, 239: 1534-1536). Tento postup měl nicméně několik nedostatků: výsledná protilátka měla běžně sníženou afinitu a řada základních zbytků se musela pro obnovení vazby zpětně mutovat na odpovídající myší systémy (Rietchmann a spol. (1988): Reshaping human antibodies for therapy, *Nature*, 332: 323-327; Queen a spol. (1989): A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, *PNAS USA*, 86: 10029-10033; Tempest a spol. (1991): Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection *in vivo*, *Biotechnology*, 9: 266-272). Kromě toho se běžně pozorovalo, že imunogenita přetrvávala v protilátkách s transplantovanými CDR.

Mateo a spolupracovníci (US patent číslo US 5 712 120) popsali způsob snížení imunogenity myších protilátek. Podle tohoto způsobu se modifikace omezují na variabilní domény a konkrétně na myší oblasti základních zbytků (FR) chimerních protilátek. Kromě toho se záměny provádějí pouze v těch oblastech FR, které mají amfipatické sekvence, a proto jsou možnými epitopy rozpoznatelnými T buňkami. Způsob zahrnuje uvážlivou záměnu několika málo zbytků aminokyselin lokalizovaných v potenciálních imunogenních epitopech za odpovídající zbytky z lidské sekvence s nejvyšší homologií, musí se však uchovat aminokyseliny, které jsou hlavně odpovědné za kanonické struktury a také zbytky v bezprostředním sousedství oblastí CDR nebo ve Vernierově zóně.

Výsledná protilátka si uchovává svoji specifitu vazby antigenu a je méně imunogenní než buď její myší nebo chimerní předchůdce (Mateo a spol. (2000): Removal of T cell epitopes from genetically engineered antibodies: Production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity, *Hybridoma*, 19: 463-

471), což jsou vlastnosti, které zvyšují jejich terapeutickou užitečnost. Použitím tohoto nového způsobu se musí provést pouze několik málo mutací a samozřejmě méně genových manipulací.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou rekombinantní protilátky získané technologií genového inženýrství. Konkrétně je předmětem vynálezu chimerní protilátka získaná z myší monoklonální protilátky P3, kterou produkuje buněčná linie hybridomu s depozitním číslem ECACC 94113026. MAb P3 rozpoznává antigen exprimovaný v buňkách nádoru prsu a melanomech. MAb P3 se vyznačuje následujícími sekvencemi hypervariabilních oblastí (CDR) těžkého a lehkého řetězce:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

CDR1: RYSVH

CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS

CDR3: SGVREGRAQAWFAY

LEHKÝ ŘETĚZEC

CDR1: KASQDVSTAVA

CDR2: SASYRYT

CDR3: QQHYSTPWT

Sekvence oblastí základních zbytků (FR) těžkého a lehkého řetězce jsou výhodně následující:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

FR1: QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL

FR2: WVRQPPGKGLEWLG

FR3: RLSISKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

FR4: WGQGT LV

LEHKÝ ŘETĚZEC

FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

FR2: WYQQKPGQSPKLLIY

FR3: GVPDRFTGSGSGTDFTFITISSVQAEDLAVYYC

FR4: FGGGTKL

Chimerní protilátka předloženého vynálezu ve výhodném provedení obsahuje konstantní oblast těžkého řetězce lidského IgG1 a konstantní oblast lehkého řetězce lidského Ck.

V dalším aspektu je předmětem předloženého vynálezu humanizovaná protilátka odvozená z MAb P3, kterou produkuje buněčná linie hybridomu s depozitním číslem ECACC 94113026 vyznačující se tím, že obsahuje konstantní oblast lidského těžkého řetězce IgG1 a konstantní oblast lidského lehkého řetězce Ck a že oblasti FR lehkého řetězce obsahují kteroukoli z následujících bodových mutací:

LEHKÝ ŘETĚZEC:

pozice 8: His za Pro

pozice 9: Lys za Ser

pozice 10: Phe za Ser

pozice 11: Met za Leu

pozice 13: Thr za Ala

V jiném aspektu je předmětem předloženého vynálezu chimerní protilátka odvozená z myši monoklonální protilátky 1E10, kterou produkuje buněčná linie hybridomu s depozitním číslem ECACC 97112901 a která je antiidiotypovou protilátkou rozpoznávající MAb P3. MAbai 1E10 se vyznačuje následujícími sekvencemi hypervariabilních oblastí (CDR) těžkého a lehkého řetězce:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG

CDR3: EDYYDNSYYFDY

LEHKÝ ŘETĚZEC

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

Sekvence oblastí FR těžkého a lehkého řetězce jsou výhodně následující:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

FR4: WGQGTTLTV

LEHKÝ ŘETĚZEC

FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

FR4: FGGGTKLESK

Ve výhodném provedení obsahuje chimerní protilátka předloženého vynálezu konstantní oblast těžkého řetězce lidského IgG1 a konstantní oblast lehkého řetězce lidského Ck. V dalším aspektu je předmětem předloženého vynálezu humanizovaná protilátka získaná z MAb 1E10, kterou produkuje buněčná linie hybridomu s depozitním číslem ECACC 97112901, vyznačující se tím, že obsahuje konstantní oblast lidského těžkého řetězce IgG1 a konstantní oblast lidského lehkého řetězce Ck a že oblasti FR těžkého a lehkého řetězce obsahují kteroukoli z následujících bodových mutací:

LEHKÝ ŘETĚZEC

pozice 7: Thr za Ser

pozice 8: Thr za Pro

pozice 15: Leu za Val

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

pozice 5: Gin za Val

pozice 40: Arg za Ala

pozice 42: Glu za Gly

pozice 87 (83 podle Kabatova číslování): Thr za Arg

V dalším aspektu jsou předmětem předloženého vynálezu buněčné linie, které exprimují popsané chimerní a humanizované protilátky. Předmětem předloženého vynálezu jsou navíc farmaceutické kompozice obsahující popsané protilátky.

Výhodně jsou předmětem vynálezu farmaceutické kompozice pro léčbu nádorů prsu, plic, trávicí soustavy, urogenitálního systému, melanomů, sarkomů a neuroektodermatických nádorů, jejich metastází a relapsů obsahující popsané protilátky a vhodnou pomocnou látku.

Dalším předmětem reprezentace předloženého vynálezu je možnost použít farmaceutické kompozice pro lokalizaci a diagnózy nádorů prsu, plic, trávicí soustavy, urogenitálního systému, melanomů, sarkomů a neuroektodermatických nádorů, jejich metastází a relapsů *in vivo*.

Syntéza cDNA a amplifikace genu pomocí PCR (řetězové polymerasové reakce) variabilních oblastí MAb P3 a MAbai 1E10.

Cytoplasmatická RNA se extrahovala z asi 106 buněk hybridomu P3 (myší IgM MAb, která rozpoznává GM3 N-glykolový gangliosid) nebo 1E10 (protilátka antiidiotypu proti P3). RNA se extrahovala s použitím reagentie TRIZOL (GIBCO BRL, Grand Island, NY), podle instrukcí výrobce.

Reakce syntézy cDNA se provedla smíšením 5 µg RNA, 25 pmolů VH (komplementární ke konstantní oblasti myší IgM pro VH P3 a ke konstantní oblasti myší IgG1 pro VH 1E10) nebo VK (komplementární ke konstantní myší kapa oblasti pro obě protilátky), 2,5 mM každého dNTP, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 8 mM MgCl₂ a 15 jednotek inhibitoru RNA

polymerasy v 50 μ L reakční směsi. Deset minut se směs zahřívala na 70 °C a pomalu se ochladila na 37 °C. Potom se přidalo 100 jednotek enzymu MLV reversní transkriptasy a inkubace pokračovala při 42 °C jednu hodinu.

Variabilní oblasti VK a VH cDNA se amplifikovaly pomocí PCR. Krátce, 5 μ L cADN VH nebo VK se smíchalo s 25 pmoly specifických primerů, 2,5 mM každé dNTP, 5 μ L složek 10X pufru Taq DNA polymerasy a 1 jednotkou tohoto enzymu. Vzorky se podrobily 25 teplotním cyklům při 94 °C, 30 sekund; při 50 °C 30 sekund; při 72 °C, 1 minutu a poslední inkubaci při 72 °C po dobu 5 minut.

Klonování a sekvenování amplifikované cDNA.

PCR produkty VH a VK (z P3 a z 1E10) se klonovaly do TA vektoru (TA klonovací souprava, Promega, USA). Výsledné klony se sekvenovaly pomocí dideoxy způsobu s použitím T7 DNA polymerasy (T7 sekvenovací souprava, Pharmacia, Švédsko).

Konstrukce chimerních genů.

Geny VH a VK se vystřihly z TA vektorů enzymatickou digescí a klonovaly se do odpovídajících expresních vektorů (Coloma a spol. (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, *J. Immunol. Meth.*, 152: 89-104).

Geny VH se vystřihly z TA vektoru pomocí enzymatické digesce s EcoRV a NheI a klonovaly se do expresního vektoru (PAH 4604), který zahrnoval variabilní region lidské IgG1 a geny resistantní k histidinolu. Výsledné konstrukce byly P3VH-PAH4604 a 1E10VH-PAH4604. Geny VK se vystřihly z TA vektoru pomocí enzymatické digesce s EcoRV a Sall a klonovaly se do expresního

vektoru (PAG4622). Tento vektor obsahoval resistantní geny k mykofenolové kyselině a lidskou kapa konstantní oblast. Výsledné konstrukce byly P3VK-PAG4622 a 1E10VK-PAG4622.

Expresse chimerních protilátek získaných z MAb P3 a MAbid 1E10.

Buňky NS-0 se podrobily elektroporaci s 10 µg P3VK-PAG4622 nebo 1E10VK-PAG4622, klony exprimující lidské kapa lehké řetězce se transfektovaly s 10 µg P3VH-PAH4604 nebo 1E10VH-PAH4604.

DNA se linearizovaly digescí s enzymem PvuI, precipitovaly ethanolem a rozpustily v 50 µL PBS. Odstředěním se sklídilo přibližně 10^7 buněk a resuspendovaly se v 0,5 mL PBS společně s digestovanou DNA v kyvetě pro elektroporaci. Po desetiminutovém ponechání na ledu byly buňky vystaveny impulsu 200 Voltů a 960 µF a ponechaly se na ledu dalších deset minut. Buňky se distribuovaly na 96 jamkovou destičku s D'MEM F12 s 10 % fetálním telecím sérem. Po dvou až čtyřech dnech se přidalo selektivní médium (D'MEM F12 s 0,45 µg/mL mykofenolové kyseliny nebo 10 mM histidinolu). Transfektované klony byly po 14 dnech viditelné pouhým okem.

Přítomnost lidské protilátky v médiu jamek obsahujících trasfektované klony se měřila pomocí ELISA. Jamky mikrotitrační destičky se smočily kozími protilátkami proti lidskému kapa lehkému řetězci (pro klony produkující lidský kapa řetězec) nebo protilátkami proti lidskému IgG (specifický pro gama řetězec) (pro klony produkující kompletní protilátku). Po promytí s PBST (slaný fosfátem tlumený roztok obsahující 0,05 % Tweenu 20) se na jednu hodinu při 37 °C přidalo do každé mikrotitrační jamky zředěné kultivační médium z jamek obsahujících transfektanty. Jamky se promyly s PBS-T a přidala se kozí protilátka proti lidskému kapa lehkému řetězci konjugovaná křenovou peroxidasou nebo kozí anti-lidský IgG (specifický pro gama řetězec)

konjugovaný alkalickou fosfatase a jednu hodinu se inkubovaly při 37 °C. Jamky se promyly PBS-T a přidal se substrátový pufr obsahující o-fenylendiamin nebo p-nitrofenyl-fosfát. Po půl hodině se měřila absorbance při 492 nebo 405 nm.

Konstrukce humanizovaných protilátek P3hu a 1E10hu pomocí humanizace epitopů T buněk. Predikce epitopů T buněk.

Sekvence variabilních oblastí P3 a 1E10 se analyzovaly algoritmem AMPHI (Margalit a spol. (1987): Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence, *J. Immunol.*, 138: 2213-2229). Vyhledávaly se spirálovité amfipatické segmenty se sedmi nebo jedenácti zbytky aminokyselin, které byly spojené s T imunogenitou. Program SOHHA také předpovídal spirálovité hydrofobní segmenty. (Elliot a spol. (1987): An hypothesis on the binding of an amphipathic, alpha helical sequence in Ii to the desotope of class II antigen, *J. Immunol.*, 138: 2949-2952). Oba programy předpovídají, které segmenty ze sekvencí variabilní oblasti protilátky P3 a 1E10 by mohly být prezentovány T pomocným buňkám v kontextu molekul MHC třídy II.

Analýza homologie s lidskými imunoglobuliny.

Sekvence aminokyselin myších variabilních oblastí se porovnávaly se sekvencemi imunoglobulinů v databázích GeneBank a EMBL (přístupných na internetu). Pro každou protilátku se stanovily lidské variabilní oblasti s nejvyšší homologií. Pro vyhledávání homologie sekvencí se použil software PC-TWO HIBIO PROSIS 06-00.

Analýza snížení imunogenity.

Cílem způsobu je snížení imunogenity zmírněním nebo

humanizováním potenciálních imunogenních T epitopů s minimálními změnami. Způsob zahrnuje uvážlivé nahrazení několika málo zbytků aminokyselin umístěných v spirálovitých amfipatitických segmentech. Aminokyseliny, které hlavně odpovídají za kanonické struktury a také zbytky v bezprostředním sousedství sekvencí CDR nebo ve Vernierově zóně, se musí zachovat.

Sekvence myší variabilní oblasti se podle tohoto způsobu porovnaly s lidskými sekvencemi s nejvyšší homologií a identifikovaly se rozličné zbytky aminokyselin v každé pozici mezi myší MAb a lidskou sekvencí s nejvyšší homologií, přičemž se braly do úvahy pouze zbytky ve FR (Kabat a spol. (1991), *Sequences of proteins of immunological interest*, páté vydání, National Institute of Health), a předtím definované zbytky se nahradily těmi zbytky, které se nacházejí v lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Nahrazení se provedlo řízenými technikami mutageneze.

Zbytky zapojené do třírozměrné struktury vazebného místa se nemutovaly; mohly by ovlivnit rozpoznání antigenu. Další informace o vlivu náhrad v terciární struktuře lze získat molekulárním modelováním vazebného místa antigenu.

Musí se pamatovat na přítomnost zbytků prolinu ve spirálovitém amfipatickém segmentu a na skutečnost, že určité myší zbytky se neobjeví ve stejné pozici v lidské sekvenci s nejvyšší homologií, ale jsou hojné v dalších lidských imunoglobulinech. Z tohoto důvodu neexistuje jedinečný soubor myších aminokyselin, který by se vyměnil v systémech. Je možné získat rozličné verze modifikované protilátky s rozličným počtem náhrad. Mutace se prováděly překrývajícími se reakcemi PCR.

Klonování a exprese humanizovaných protilátek P3hu a 1E10hu.

Genové konstrukce odpovídající P3hu a 1E10hu se klonovaly expresními vektory způsobem popsaným pro chimerní protilátky. Resultující konstrukce byly P3VKhu-PAG4622 nebo 1E10VKhu-PAG4622 a P3VHhu-PAH4604 a 1E10VHhu-PAH4604. Tyto konstrukce se transfektovaly do buněk NS-0 podle dříve popsaného protokolu pro chimerní protilátky.

Čištění rekombinantních protilátek.

Rekombinantní protilátky se čistily s použitím afinitní chromatografie s proteinem A (Pharmacia, Upssala, Švédsko).

Biologická aktivita.

Biologická aktivita rekombinantních protilátek se testovala měřením specifické vazby na antigen pomocí ELISA.

Pro rekombinantní MAb P3 se mikrotitrační destička smočila GM3(NeuGc) gangliosidem v methanolu. Po jednohodinovém sušení se nespecifické vazby blokovaly 1 % hovězím sérovým albuminem (BSA) v Tris-HCl pufru inkubací po dobu jedné hodiny při 37 °C. Jamky se promyly PBS a jednu hodinu inkubovaly při 37 °C s vyčištěnou rekombinantní MAb P3. Jamky se promyly Tris-HCl a přidala se kozí antilidská protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou a jednu hodinu se inkubovaly při 37 °C. Nakonec se jamky promyly a přidal se substrátový pufr obsahující p-nitrofenylfosfát. Po půl hodině se změřily absorbance při 405 nebo 492 nm.

Pro rekombinantní MAbai 1E10 byla zkouška ELISA podobná, s výjimkou, že se jamky smočily MAb P3 a promývání se provádělo v PBS s 0,05 % Tweenu 20.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: VHP3 DNA a dedukované sekvence aminokyselin. Sekvence jsou seřazeny podle Kabatova číslování (Kabat a spol. (1991): *Sequences of proteins of immunological interest*, páté vydání, National Institute of Health), příslušné sekvence CDR jsou vyznačeny čarami.

Obr. 2: VKP3 a dedukované sekvence aminokyselin. Sekvence jsou seřazeny podle Kabatova číslování (Kabat a spol. (1991): *Sequences of proteins of immunological interest*, páté vydání, National Institute of Health), příslušné sekvence CDR jsou vyznačeny čarami.

Obr. 3: VHP3 se přidaly k lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Amfipatické segmenty jsou podtrženy a sekvence CDR jsou zvýrazněny tučně.

Obr. 4: VKP3 se přidaly k lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Amfipatické segmenty jsou podtrženy a sekvence CDR jsou zvýrazněny tučně.

Obr. 5: Specifická vazba chimerní MAb P3 k GM3(NeuGc). Rozličné koncentrace MAb P3 a MAb T1 (negativní kontrola) se testovaly pomocí ELISA. Mikrotitrační destičky se smočily s gangliosidy GM3(NeuGc) a GM3(NeuAc) (negativní kontrola) v methanolu a měřila se specifická vazba. (Značení bodů: ◆ - GM3-P3, ■ - chimerní GM3(NeuGc)-P3, ▲ - chimerní GM3(NeuGc)-T1, ● - chimerní GM3-T1)

Obr. 6: VH1E10 DNA a dedukované sekvence aminokyselin. Sekvence jsou seřazeny podle Kabatova číslování (Kabat a spol. (1991): *Sequences of proteins of immunological interest*, páté vydání,

National Institute of Health), příslušné sekvence CDR jsou vyznačeny čárami.

Obr. 7: VK1E10 a dedukované sekvence aminokyselin. Sekvence jsou seřazeny podle Kabatova číslování (Kabat a spol. (1991): *Sequences of proteins of immunological interest*, páté vydání, National Institute of Health), příslušné sekvence CDR jsou vyznačeny čárami.

Obr. 8: VH1E10 se přidaly k lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Amfipatické segmenty jsou podtrženy a sekvence CDR jsou zvýrazněny tučně.

Obr. 9: VK1E10 se přidaly k lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Amfipatické segmenty jsou podtrženy a sekvence CDR jsou zvýrazněny tučně.

Obr. 10: Specifická vazba myší MAb P3 chimerní MAb 1E10. Rozličné koncentrace MAb 1E10 a MAb C5 (negativní kontrola) se testovaly pomocí ELISA. Mikrotitrační destičky se smočily s MAb P3 a MAb A3 (negativní kontrola) a měřila se specifická vazba. (Značení bodů: ◆ - chimerní MAb P3-1E10, ■ - chimerní MAb A3-1E10, ▲ - chimerní MAb P3-C5, x - chimerní MAb A3-C5)

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech se všechny použité enzymy, jakož i reagentie a materiály získaly z komerčních zdrojů, pokud se neuvádí něco jiného.

Příklad 1: Získání chimerní MAb P3.

Syntéza cDNA se provedla reakcí s enzymem reversní transkriptasy, když se vycházelo z RNA z hybridomu, který

produkuje MAb P3, jak se popsalo výše. Sekvence specifických primerů použitých v této reakci byly:

Pro VH:

5' AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC 3'

Pro VK:

5' GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG 3'

cdNA VHP3 a cdNA VKP3 se amplifikovaly pomocí PCR s použitím Taq Polymerasy a specifických primerů. Restrikční místa zahrnutá v primerech byly ECORV/NHEI pro VH a ECORV/SALI pro VK. Použité primerové sekvence byly následující:

Pro VH:

Primer 1 (signální peptid):

5' GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Primer 2 (CH1):

5' GGGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT 3'

Pro VK:

Primer 1 (signální peptid):

5' GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)T 3'

Primer 2 (Ck):

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

PCR produkty se klonovaly do TA vektoru (TA klonovací souprava, Invitrogen). Dvanáct nezávislých klonů se sekvenovalo dideoxy způsobem s použitím T7 DNA Pol (Pharmacia). Vyhledávací analýzou homologie se stanovila sekvenční skupina s nejvyšší homologií pro VHP3 a VKP3. Sekvence VHP3 a VKP3 (obr. 1 a 2) mají vysokou homologii s odpovídajícími skupinami IB a V podle Kabatovy klasifikace.

Po digesci s restrikčními enzymy ECORV a NHEI pro VHP3 a ECORV a SALI pro VKP3 se klonovaly v expresních vektorech, které se dříve digestovaly se stejnými enzymy, PAH4604 pro VH a

PAG4622 pro VK. Tyto expresní vektory vhodné pro expresi imunoglobulinů v savčích buňkách byly darem od Sherie Morrison (UCLA, Kalifornie, USA). Vektor PAH 4604 zahrnoval lidskou konstantní oblast IgG1 a PAG 4622 lidskou variabilní oblast (Coloma a spol. (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, *J. Immunol. Meth.*, 152: 89-104). Výsledné konstrukty byly P3VH-PAH4604 a P3VK-PAG4622.

Buňky NA-0 se transfektovaly s 10 µg P3VK-PAG4622, klon exprimující lehký řetězec se transfektoval s 10 µg P3VH-PAH4604, v obou případech se DNA před transfekcí linearizovala s PvuI, precipitovala ethanolem a rozpustila v 50 µL PBS.

Přibližně 10^7 buněk se sklídilo centrifugací a resuspendovalo se v 0,5 mL PBS společně s digestovanou DNA v kyvetě pro elektroporaci. Po uložení na deset minut na led byly buňky vystaveny pulsu 200 V a 960 µF a ponechaly se v ledu dalších deset minut. Buňky se rozdělily do 96 jamek destičky s D'MEM F12 plus s 10 % fetálním telecím sérem. Po dvou nebo čtyřech dnech se přidalo selektivní médium (D'MEM F12 s 0,45 µg/mL kyseliny mykofenolové nebo 10 mM histidinolu). Transfektované klony byly viditelné po čtrnácti dnech pouhým okem.

Přítomnost lidské protilátky v médiu jamek obsahujících trasfektované klony se měřila pomocí ELISA. Jamky mikrotitrační destičky se smočily kozími protilátkami proti lidskému kapa lehkému řetězci (pro klony produkující lidský kapa řetězec) nebo protilátkami proti lidskému IgG (specifický pro gama řetězec) (pro klony produkující kompletní protilátku). Po promytí s PBST (slaný fosfátem tlumený roztok obsahující 0,05 % Tweenu 20) se do každé mikrotitrační jamky při 37 °C na jednu hodinu přidalo zředěné kultivační médium z jamek obsahujících transfektanty. Jamky se promyly PBST a přidala se kozí protilátka proti

lidskému kapa lehkému řetězci konjugovaná křenovou peroxidasou nebo kozí anti-lidský IgG (specifický pro gama řetězec) konjugovaný s alkalickou fosfatasou a jednu hodinu se inkubovaly při laboratorní teplotě. Jamky se promyly PBS-T a přidal se substrátový pufr obsahující o-fenylendiamin nebo p-nitrofenyl-fosfát. Po půl hodině se měřila absorbance při 492 nebo 405 nm.

Příklad 2: Získání rozličných verzí humanizované protilátky P3.

Sekvence myších VHP3 a VKP3 (obr. 1 a 2) se porovnály s lidskými sekvencemi. Na obr. 3 a 4 jsou ukázané lidské sekvence s nejvyšší homologií. Spirálovité amfipatické oblasti nebo potenciální T buněčné epitopy se vyhledávaly v sekvencích myši P3 variabilní oblasti a ve shodě se způsobem uvážlivé strategie se stanovily náhrady aminokyselin, aby se narušily nebo humanizovaly potenciální T buněčné epitopy v myších sekvencích.

Analýza VHP3 poskytla (obr. 3) dva amfipatické segmenty, první zahrnoval CDR1, FR2 a několik zbytků CDR2, druhý zahrnoval konec FR3 a CDR3. Hlavní rozdíly myších sekvencí ve srovnání s lidskými sekvencemi s nejvyšší homologií byly nalezeny v sekvencích CDR nebo zbytcích zapojených do třírozměrné struktury vazebného místa. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto nenahrazovat žádnou aminokyselinu v myším VHP3.

Analýza VKP3 poskytla také dva amfipatické segmenty (obr. 4), první zahrnoval FR1, druhý zahrnoval CDR2 a několik zbytků FR3. Bylo rozhodnuto nahradit zbytky v pozicích 8, 9, 10, 11 a 13 za zbytky ve stejných pozicích v lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Aminokyseliny His, Lys, Phe, Met a Thr se nahradily aminokyselinami Pro, Ser, Ser, Leu a Ala. Nahrazení se provedlo překryvnou PCR (Kammann a spol. (1989): Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), *Nucleic*

Acids Res., 17: 5404) s použitím primerů 1, 2, 3, 4, sekvence kterých jsou následující:

Primer 1:

5' ATGACCCAGTCTCCTTCTTCTCTTTCCGCGTCAGTAGGAGAC 3'

Primer 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT (TG) ATTTCCA (GA) CTT (GT) GTCCC 3'

Primer 3:

5' GTCTCCTACTGACGCGGAAAGAGAAGAAGGAGACTGGGTCAT 3'

Primer 4:

5' GGGGATATCCACCATGGAG (TA) CACA (GT) (TA) CTCAGGTCTTT (GA) T 3'

Body mutace se verifikovaly sekvenováním. Výsledný konstrukt byl P3VKhu a klonoval se do expresního vektoru PAG 4662. Výsledný konstrukt byl P3VKhu-PAG4622. Pro expresi humanizované protilátky P3 se buňky NS-0 transfektovaly s P3VH-PAH4604 a P3VKhu-PAG4622.

Protilátka P3hu se transfektovala podle stejného postupu elektroporace a detekce, jak se popisuje výše pro chimerní protilátky.

Příklad 3: Biologická aktivita chimerní MAb P3.

Biologická aktivita chimerní MAb P3 se testovala měřením specifické vazby na antigen pomocí ELISA.

Pro rekombinantní MAb P3 se mikrotitrační destička smočila gangliosidem GM3 (NeuGc) v methanolu. Po jednohodinovém sušení při 37 °C se nespecifické vazby blokovaly 1 % hovězím sérovým albuminem (BSA) v Tris-HCl pufru inkubací po dobu jedné hodiny při 37 °C. Jamky se promyly PBS a jednu hodinu inkubovaly při 37 °C s vyčištěnou rekombinantní MAb P3. Jamky se promyly Tris-HCl a přidala se kozí anti-lidská protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou a jednu hodinu se inkubovaly při 37 °C.

Nakonec se jamky promyly s Tris-HCl a přidal se substrátový pufr obsahující *p*-nitrofenylfosfát. Po půl hodině se změřila absorbance při 405 nm.

Jako negativní kontrola se použila chimerní MAb T1. Specifickou vazbu chimerní MAb P3 na antigen ukazuje obr. 5.

Příklad 4: Získání chimerní MAb 1E10.

Syntéza cDNA se provedla reakcí s enzymem reversní transkriptasy, když se vycházelo z RNA z hybridomu, který produkuje MAb 1E10, jak se popsalo výše. Sekvence specifických primerů použitých v této reakci byly:

Pro VH:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Pro VK:

5' GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGGA 3'

cDNA VH1E10 a cDNA VK1E10 se amplifikovaly pomocí PCR s použitím Taq Pol a specifických primerů.

Pro VH:

Primer 1 (signální peptid):

5' GGGGATATCCACCATGG (AG) ATG (CG) AGCTG (TG) GT (CA) AT (CG) CTCTT 3'

Primer 2 (CH1):

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Pro VK:

Primer 1 (signální peptid):

5' GGGGTTAACCACCATGAGG (GT) CCCC (AT) GCTCAG (CT) T (CT) CT (TG) GG (GA) 3'

Primer 2 (Ck):

5' AGCGTCGACTTACGTTT (TG) ATTTCCA (GA) CTT (GT) GTCCC 3'

PCR produkty se klonovaly do TA vektoru (TA klonovací souprava, Invitrogen). Dvanáct nezávislých klonů se sekvenovalo

(obr. 7 a 8) dideoxy způsobem s použitím T7 DNA Pol (Pharmacia). Vyhledávací analýzou homologie se stanovila sekvenční skupina s nejvyšší homologií pro VH1E10 a VK1E10. Sekvence VH1E10 a VK1E10 mají vysokou homologii s odpovídajícími různorodými skupinami a V podle Kabatovy klasifikace.

Po digesci s restrikčními enzymy EcorV a NheI pro VH1E10 a s HincII a SalI pro VK1E10 se klonovaly v expresních vektorech po dřívější digesci se stejnými enzymy, PAH4604 pro VH a PAG4622 pro VK. Tyto expresní vektory vhodné pro expresi imunoglobulinů v savčích buňkách byly darem od Sherie Morrison (UCLA, Kalifornie, USA). Vektor PAH 4604 zahrnoval lidskou konstantní oblast IgG1 a PAG 4622 lidskou variabilní oblast (Coloma a spol. (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, *J. Immunol. Meth.*, 152: 89-104). Výsledné konstrukty byly 1E10VH-PAH4604 a 1E10VK-PAG4622.

Buňky NA-0 se transfektovaly s 10 µg 1E10VK-PAG4622, klon exprimující lehký řetězec se transfektoval s 10 µg 1E10VH-PAH4604, v obou případech se před transfekcí DNA linearizovala s PvuI, precipitovala ethanolem a rozpustila v 50 µL PBS.

Přibližně 10^7 buněk se sklídilo centrifugací a resuspendovalo v 0,5 mL PBS společně s digestovanou DNA v kyvetě pro elektroporaci. Po uložení na deset minut na led se buňky vystavily pulsu 200 V a 960 µF a ponechaly se v ledu dalších deset minut. Buňky se rozdělily do 96 jamek destičky s D'MEM F12 plus s 10 % fetálním telecím sérem. Po dvou nebo čtyřech dnech se přidalo selektivní médium (D'MEM F12 s 0,45 µg/mL kyseliny mykofenolové nebo 10 mM histidinolu). Transfektované klony byly viditelné po čtrnácti dnech pouhým okem.

Přítomnost lidské protilátky v médiu jamek obsahujících

trasfektované klony se měřila pomocí ELISA. Jamky mikrotitrační destičky se smočily kozími protilátkami proti lidskému kapa lehkému řetězci (pro klony produkující lidský kapa řetězec) nebo protilátkami proti lidskému IgG (specifický pro gama řetězec) (pro klony produkující kompletní protilátku). Po promytí s PBST (slaný fosfátem tlumený roztok obsahující 0,05 % Tween 20) se do každé mikrotitrační jamky při 37 °C na jednu hodinu přidalo zředěné kultivační médium z jamek obsahujících transfektanty. Jamky se promyly PBST a přidala se kozí protilátka proti lidskému kapa lehkému řetězci konjugovaná křenovou peroxidasou nebo kozí anti-lidský IgG (specifický pro gama řetězec) konjugovaný s alkalickou fosfatasou a jednu hodinu se inkubovaly při laboratorní teplotě. Jamky se promyly PBS-T a přidal se substrátový pufr obsahující o-fenylendiamin nebo p-nitrofenylfosfát. Po půl hodině se měřila absorpance při 492 nebo 405 nm.

Příklad 5: Získání rozličných verzí humanizované protilátky 1E10.

Sekvence myši VH1E10 a VK1E10 (obr. 6 a 7) se porovnaly s lidskými sekvencemi. Lidské sekvence s nejvyšší homologií ukazují obr. 8 a 9. Spirálovité amfipatické oblasti nebo potenciální T buněčné epitopy se vyhledávaly v sekvencích myši 1E10 variabilní oblasti a ve shodě se způsobem uvážlivé strategie se stanovily náhrady aminokyselin, aby se narušily nebo humanizovaly potenciální T buněčné epitopy v myších sekvencích.

Analýza VH1E10 poskytla (obr. 8) tři amfipatické segmenty, první zahrnoval FR1, druhý zahrnoval FR2 a třetí zahrnoval FR3. Bylo rozhodnuto nahradit zbytky v pozicích 5, 40, 42 a 87 (83 podle Kabatova číslování) zbytky ve stejných pozicích v lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Aminokyseliny Gln, Arg, Glu a Thr

se nahradily aminokyselinami Val, Ala, Gly a Arg. Nahrazení se provedlo překryvnou PCR (Kammann a spol. (1989): Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), *Nucleic Acids Res.*, 17: 5404) s použitím rozličných sad primerů.

Primery pro mutaci v pozici 5 těžkého řetězce byly 1, 2, 3 a 4, sekvence kterých jsou následující:

Primer 1:

5' CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCT 3'

Primer 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Primer 3:

5' AGCTCCAGACTGCACCAGCTGAACCTG 3'

Primer 4:

5' GGGGATATCCACCATGG (AG) ATG (CG) AGCTG (TG) GT (CA) AT (CG) CTCTT 3'

Po ověření pomocí sekvence bodu mutace v pozici 5, se zavedly mutace v pozicích 40 a 42.

Primer pro mutace v pozicích 40 a 42 těžkého řetězce:

Primer 1:

5' TGGGTGAGGCAGGCGCCTGGGCAGGGACTTGAG 3'

Primer 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Primer 3:

5' CTCAAGTCCCTGCCCAGGCGCCTGCCTCACCCA 3'

Primer 4:

5' GGGGATATCCACCATGG (AG) ATG (CG) AGCTG (TG) GT (CA) AT (CG) CTCTT 3'

Po ověření pomocí sekvence bodu mutace v pozicích 40 a 42, se zavedla mutace v pozici 87 (83 podle Kabatova číslování).

Primer pro mutace v pozici 87 (83 podle Kabatova číslování) těžkého řetězce:

Primer 1:

5' CTCAGCAGGCTGCGGTCTGAGGACTCT 3'

Primer 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Primer 3:

5' AGAGTCCTCAGACCGCAGCCTGCTGAG 3'

Primer 4:

5' GGGGATATCCACCATGG (AG) ATG (CG) AGCTG (TG) GT (CA) AT (CG) CTCTT 3'

Další náhrady se neprovedly, protože zbytky byly zapojeny v třírozměrné struktuře vazebného místa.

Body mutace se verifikovaly sekvenováním. Výsledný konstrukt byl 1E10VHhu a klonoval se v PAH4604 expresním vektoru. Výsledný konstrukt byl 1E10VH-PAH4604.

Analýza pro VK1E10 poskytla také tři amfipatické segmenty (obr. 9), první zahrnoval FR1, druhý zahrnoval CDR1 a třetí zahrnoval FR3. Bylo rozhodnuto nahradit zbytky v pozicích 7, 8 a 15 zbytky ve stejných pozicích v lidské sekvenci s nejvyšší homologií. Aminokyseliny Thr, Thr a Leu se nahradily aminokyselinami Ser, Pro a Val. Nahrazení se provedlo překryvnou PCR (Kammann a spol. (1989): Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), *Nucleic Acids Res.*, 17: 5404) s použitím primerů 1, 2, 3 a 4, kterých sekvence jsou následující:

Primery pro mutace v pozicích 7, 8 a 15 lehkého řetězce:

Primer 1:

5' CAGATGACACAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTC 3'

Primer 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT (TG) ATTTCCA (GA) CTT (GT) GTCCC 3'

Primer 3:

5' GACTCTGTCTCCACAGAGGCAGACAGGGAGGAAGGAGACTGTGTCATCTG 3'

Primer 4:

5' GGGGTTAACCACCATGAGG (GT) CCCC (AT) GCTCAG (CT) T (CT) CT (TG) GG (GA) 3'

Body mutací se ověřily sekvenováním. Výsledný konstrukt byl 1E10VKhu a klonoval se v expresním vektoru PAG 4622. Výsledný konstrukt byl 1E10VKhu-PAG4662.

Pro expresi humanizované protilátky 1E10 se buňky NS-0 transfektovaly 1E10VHhu-PAH4604 a 1E10VKhu-PAG4662.

Protilátka 1E10hu se transfektovala stejným postupem elektroporace a detekce, jak byl výše popsán pro chimerní protilátky.

Příklad 6: Biologická aktivita chimerní MAb 1E10.

Biologická aktivita chimerní MAb 1E10 se testovala měřením specifické vazby na antigen pomocí ELISA.

Pro rekombinantní MAb 1E10 se mikrotitrační destička smočila MAb P3. Po promytí s PBST (roztok solného fosfátového pufru obsahující 0,05 % Tweenu 20) se nespecifické vazby blokovaly 1 % hovězím sérovým albuminem (BSA) v PBST inkubací po dobu jedné hodiny při 37 °C. Jamky se promyly a jednu hodinu inkubovaly při 37 °C s vyčištěnou rekombinantní MAb 1E10. Jamky se promyly PBST a přidala se antilidská kozí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase a jednu hodinu se inkubovaly při 37 °C. Nakonec se jamky promyly PBST a přidal se substrátový pufr obsahující p-nitrofenylfosfát. Po půl hodině se změřily odpovídající absorbance při 405 nm.

Jako negativní kontrola se použila chimerní MAb C5.
Specifickou vazbu chimerní MAb 1E10 na MAb P3 ukazuje obr. 10.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Chimerní monoklonální protilátka odvozená z myši monoklonální protilátky MAb P3, která rozpoznává gangliosidy obsahující N-glykolovou kyselinu sialovou a která se produkuje buněčnou linií hybridomu s depozitním číslem ECACC 94113026, vyznačující se tím, že hypervariabilní domény jejich těžkých a lehkých řetězců obsahují následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

CDR1: RYSVH

CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS

CDR3: SGVREGRAQAWFAY

LEHKÝ ŘETĚZEC

CDR1: KASQDVSTAVA

CDR2: SASYRYT

CDR3: QQHYSTPWT

2. Chimerní monoklonální protilátka podle nároku 1 vyznačující se tím, že oblasti základních zbytků (FR) jejich těžkých a lehkých řetězců obsahují následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

FR1: QVQLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLS

FR2: WVRQPPGKGLEWLG

FR3: RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD TAMYCAR

FR4: WGQGLTV

LEHKÝ ŘETĚZEC

FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

FR2: WYQQKPGQSPKLLIY

FR3: GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

FR4: FGGGTKL

3. Monoklonální protilátka podle nároků 1 a 2 vyznačující se tím, že pro svoji humanizaci a zachování vazebných

vlastností k antigenu zahrnuje přinejmenším jednu z následujících substitucí:

LEHKÝ ŘETĚZEC

pozice 8: His za Pro

pozice 9: Lys za Ser

pozice 10: Phe za Ser

pozice 11: Met za Leu

pozice 13: Thr za Ala.

4. Monoklonální protilátka podle nároků 1 až 3 vyznačující se tím, že konstantní oblast těžkého řetězce obsahuje sekvenci aminokyselin gama-1 řetězce a konstantní oblast lehkého řetězce obsahuje sekvenci aminokyselin kapa řetězce, obě odvozené z lidských imunoglobulinů.
5. Buněčná linie vyznačující se tím, že produkuje kteroukoli z monoklonálních protilátek podle nároků 1 až 4.
6. Farmaceutická kompozice pro léčbu maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů vyznačující se tím, že obsahuje kteroukoli z monoklonálních protilátek podle nároků 1 až 4.
7. Farmaceutická kompozice pro lokalizaci a identifikaci maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů „in vivo“ vyznačující se tím, že obsahuje kteroukoli z monoklonálních protilátek podle nároků 1 až 4.
8. Použití monoklonální protilátky z kterékoli z nároků 1 až 4 pro výrobu léku prospěšného pro léčbu maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů.
9. Chimerní monoklonální protilátka odvozená z myší anti-idiotypové monoklonální protilátky 1E10, která rozpoznává myší MAb P3 a která se produkuje buněčnou linií hybridomu s depozitním číslem ECACC 97112901, vyznačující se

tím, že hypervariabilní oblasti jejich těžkých a lehkých řetězců obsahují následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG

CDR3: EDYYDNSYYFDY

LEHKÝ ŘETĚZEC

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

10. Monoklonální protilátka podle nároku 9 vyznačující se tím, že oblasti základních zbytků (FR) jejich těžkých a lehkých řetězců obsahují následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

FR4: WGQGTTLTV

LEHKÝ ŘETĚZEC

FR1: DIQMTQTSSLSASLGDRVTISC

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

FR4: FGGGTKLESK

11. Monoklonální protilátka podle nároků 9 a 10 vyznačující se tím, že pro svoji humanizaci a zachování vazebných vlastností k antigenu zahrnuje přinejmenším jednu z následujících substitucí:

LEHKÝ ŘETĚZEC

pozice 7: Thr za Ser

pozice 8: Thr za Pro

pozice 15: Leu za Val

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

pozice 5: Gin za Val

pozice 40: Arg za Ala

pozice 42: Glu za Gly

pozice 87 (83 podle Kabatova číslování): Thr za Arg

12. Monoklonální protilátka podle nároků 9 až 11 vyznačující se tím, že konstantní oblast těžkého řetězce obsahuje sekvenci aminokyselin gama-1 řetězce a konstantní oblast lehkého řetězce obsahuje sekvenci aminokyselin kapa řetězce, obě odvozené z lidských imunoglobulinů.
13. Buněčná linie vyznačující se tím, že produkuje kteroukoli z monoklonálních protilátek podle nároků 9 až 12.
14. Farmaceutická kompozice pro léčbu maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů vyznačující se tím, že obsahuje kteroukoli z monoklonálních protilátek podle nároků 9 až 12.
15. Farmaceutická kompozice pro lokalizaci a identifikaci maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů „in vivo” vyznačující se tím, že obsahuje kteroukoli z monoklonálních protilátek podle nároků 9 až 12.
16. Použití monoklonální protilátky z kterékoli z nároků 9 až 12 pro výrobu léku prospěšného pro léčbu maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů.

VH P3 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
Q V Q Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S
CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG GCA CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGC ACT GTC TCT

CDR1
26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 35a 35b 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
G F S L S R Y S V H W V R Q P P G K G L E W L
GGG TTC TCA TTA TCC AGA TAT AGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG

CDR2
49 50 51 52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70
G M I W G G G G G T D Y N S A L K S R L S I S
GGA ATG ATA TGG GGT GGT GGA AGC ACA GAC TAT AAT TCA GCT CTC AAA TCC AGA CTG AGC ATC AGC

VH P3 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92
K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A M Y Y C
AAG GAC AAC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AAA ATG AAC AGT CTG CAA ACT GAT GAC ACA GCC ATG TAC TAC TGT

CDR3
93 94 95 96 97 98 99 100 100a b c d e f 101 102 103 104 105 106 107 108 109
A R S G V R E G R A Q A W F A Y W G Q G T L V
GCC AGA AGT GGG GTA CGA GAG GGA AGG GCC CAG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGC ACT CTG
GTC

Obr. 1

15.04.04
PU 2003-2668

VkP3
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
D I V M T Q S H K F M S T S S V G D R V S I T C K A
GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC

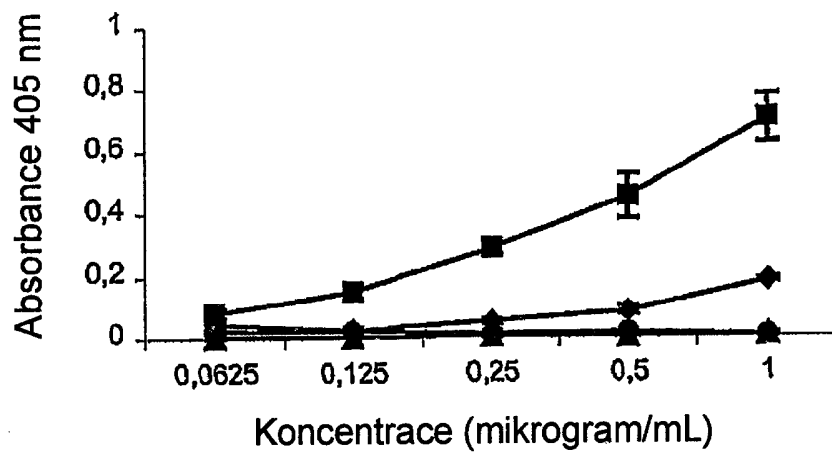
CDR1
26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
S Q D V S T A V A W Y Q Q Q S P K L L I Y S
AGT CAG GAT GTG AGT ACT GCT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC TCG

CDR2
51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
A S Y R Y T G V P D R F T G S G T D F T F T I
GCA TCC TAC CGG TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC AGT GGA TCT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC

CDR3
76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
S S V Q A E D L A V Y Y Y C Q Q Q H Y S T P W T F G G
AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG TTC GST GGA

VkP3
101 102 103 104
G T K L
GGC ACC AAG CTG

Obr. 2



Obr. 5

15.04.04
707053-2662

VK1E10
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A
GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA

VK1E10
26 27 27a 27b 27c 27d 27e 27f 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
S Q
AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT

VK1E10
45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69
K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S G S G T
AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA

VK1E10
70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94
D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C Q Q G N T L
GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC AAC CTG GAG CAA GAA GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AAT ACG CTT

VK1E10
95 95a 95b 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
P CCG W T F G G T K L E S K
TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AGC CTG GAA ATC AAA

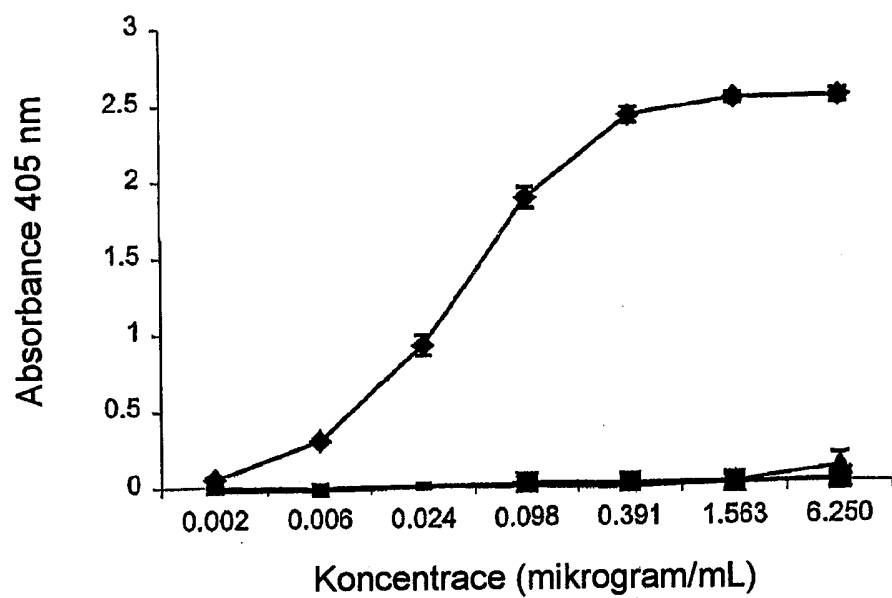
Obr. 7

15.04.04
P02013-2668

10 20 30 40 50
VK1E10 DIQMTOTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLWYQOKPDGTVKLLIYYTISRHLHSGVP
 : : : : : X : : : : : . . . : : : : : : :
huhovk DIQMTZSPSSLSASVGERVTITCRASZTISSYLBWYZZKPGKAPBLLIYAASBLHSGVP
 10 20 30 40 50

60 70 80 90 100
VK1E10 SRFSGSGTDYSLTISNIEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLESK
 : : : : : : : : : : : . : : : : X :
huhovk SRFSGSGTBTFTTISSLZPZBBFATYYCZZSYSSPTTFGZGTRLZIK
 60 70 80 90 100

Obr. 9



Obr. 10