



HU000228105B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 105**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 01695**(22) A bejelentés napja: **2002. 04. 08.**(40) A közzététel napja: **2006. 08. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2012. 11. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 3170/32** (2006.01)**A61K 317/39** (2006.01)**A61K 39/00** (2006.01)**A61K 393/95** (2006.01)**C07K 16/00** (2006.01)**C07K 16/18** (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**C07K 16/42** (2006.01)**C12N 5/20** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/CU 02/00003

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 02081496

(30) Elsőbbségi adatok:

84/2001**2001. 04. 06.****CU**

(72) Feltaláló(k):

Mateo de Acosta del Río, Cristina María, Havanna (CU)**Lombardero Valladares, Josefa, Havanna (CU)****Roque Navarro, Lourdes Tatiana, Havanna (CU)****López Requena, Alejandro, Havanna (CU)**

(73) Jogosult(ak):

**Centro de Inmunología Molecular, Havanna
(CU)**

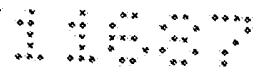
(74) Képviselő:

**dr. Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest**(54) **Gangliozidokkal asszociált rekombináns ellenanyagok és alkalmazásuk tumorok diagnózisára és kezelésére**

(57) Kivonat

A találmány módosított ellenanyagokra vonatkozik, amelyeket a Budapesti Egyezményvel összhangban az ECACC gyűjteményében 94113026 nyilvántartási számon letétbe helyezett hibridómasejtvonal által termelt P3 jelű, egéregedetű monoklonális ellenanyagból (Mab P3) vagy az annak megfelelő, az ECACC gyűjteményében 97112901 nyilvántartási számon letétbe helyezett hibridómasejtvonal által termelt 1E10 jelű, egéregedetű anti-idiotípus monoklonális ellenanyagból (MABai 1E10) rekombináns DNS-technológiákkal állítottak elő, és ezáltal az eredeti ellenanyagok specifikus antigénkötésben megnyilvánuló biológiai funkcióit megtartó, de csökkent immunogenitású monoklonális ellenanyagokat kaptak.

A találmány szerinti kiméra ellenanyagok az egéregedetű immunglobulin variábilis doménjait és a humán immunglobulin konstans régióit tartalmazzák; ezen felül, a humanizált ellenanyagok — amellet, hogy humán immunglobulin konstans régiókat tartalmaznak — az egéregedetű vázrégiókban (FR), közelebbről, T-sejtek által potenciálisan antigénként felismert helyet kialakító régiókban módosítottak úgy, hogy az FR-régiók több pozíciója ugyancsak humán szekvenciáknak felel meg. Az ellenanyagok különböző tumortípusok diagnosztikájában és terápiájában alkalmazhatóak. Szintén a találmány tárgyát képezi az ellenanyagok alkalmazása terápiás és diagnosztikus célokra.



Gangliozidokkal asszociált rekombináns ellenanyagok és alkalmazásuk tumorok diagnózisára és kezelésére

A találmány a biotechnológia szakterületére, közelebbről, génebeszeti úton előállított, új, rekombináns ellenanyagokra vonatkozik, előnyösen a P3 jelű, egéreredetű, kiméra természetű, humanizált monoklonális ellenanyag (P3 MAb), továbbá az annak megfelelő, egéreredetű, 1E10 jelű anti-idiotípus monoklonális ellenanyag (1E10 MAb, másképp MAbai 1E10) felhasználásával.

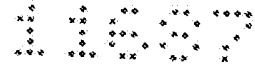
Még közelebbről, a találmány tárgyát olyan ellenanyagok képezik, amelyek felismerik az N-glikolilezett szialsavat tartalmazó gangliozidokat, de nem ismerik fel a gangliozidok acetilezett formáit, vagy a neutrális glikolipideket. Az N-glikolilezett szialsavat tartalmazó gangliozidok olyan antigének, amelyek széles körben expresszálódnak emlőrák- és melanómasejteken. Ezen felül, kimutattuk a MAb 1E10 tumorelleses hatását kísérleti modellben.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti rekombináns ellenanyagokat tartalmazó készítmények, amelyeket alkalmazhatunk rákok, elsősorban emlőrák és melanóma diagnosztizálására és kezelésére.

A gangliozidok szialsavat tartalmazó glikoszíngolipidek, amelyek gerincesek sejtjeinek citoplazma-membránjában található [Stults és mtsai.: "Glycosphingolipids: structure, biological source and properties", Methods in enzymology 179, 167-214 (1989)]. Ezen molekulák közül néhányat tumorokkal asszociált antigénként, azaz tumor markerként ismerteti a szakirodalom [Hakomori és mtsai.: „Possible functions of tumor associated carbohydrate antigens”, Curr. Opin. Immunol 3, 646-653 (1991)], ezért gangliozidok elleni ellenanyagok alkalmazásáról ismertették, hogy előnyösen alkalmazhatók rák diagnosztizálására és terápiájára [Houghton és mtsai.: „Mouse monoclonal antibody IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: to phase I trial in patients with malignant melanoma”, PNAS USA 82, 1242-1246; Zhang és mtsai.: „Selection of carbohydrate tumor antigens as targets for immune attack using immunochemistry. I. Focus on gangliosides” Int. J. Cancer 73, 42-49 (1997)].

Az állatokban leggyakrabban expresszált szialsavak N-acetil- (NeuAc) és N-glikolil- (NeuGc) csoportokat tartalmaznak [Cornfield és mtsai.: „Occurence of sialic acids”, Cell. Biol. Monogr. 10, 3-50 (1982)]. A NeuGc általában nem expresszálódik normál humán- vagy csirkeeredetű szövetekben, azonban széles körben elterjedt más gerincesekben [Leeden és Yu.: „Chemistry and analysis of sialic acid. Biological Role of Sialic acid” Szerk.: Rosenburg, A. és Shengtrund, C. L., Plenum Press, New York 1-48 (1976); Kawai és mtsai.: „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 Res. 51, 1242 (1991)]. Léteznek azonban ismertetések, amelyek arra utalnak, hogy NeuGc elleni ellenanyagok felismernek bizonyos humáneredetű tumorokat és tumorsejt-vonalakat [Higashi és mtsai.: „Detection of gangliosides as N-glycolylneuraminic acid specific tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human retinoblastoma cells”, Jpn. J. Cancer Res. 79, 952 (1998); Fukui és mtsai.: „Detection of glycoproteins as tumor associated Hanganutziu-Deicher antigen in human gastric cell line, NUGC4”, Biochem. Biophys. Res. Commun. 160, 1149 (1989)]. Gangliozidok emelt szintjét észlelték humán emlőrákban [Marquina és mtsai.: „Gangliosides expressed in human breast cancer” Cancer Res. 56, 5165 (1996)], amely eredmény a rákterápia vonzó célpontjává tette ezt a molekulát.

A P3 jelű monoklonális ellenanyag („monoclonal antibody”, MAb), amely az ECACC gyűjteményében

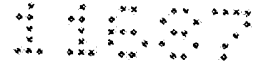


94113026 szám alatt lett letétbe helyezve (lásd az EP 0 657 471 B1 számú európai szabadalmi leírást), IgM izotípusú, egéredetű monoklonális ellenanyag, amely GM3(NeuGc)-ganglioziddal és tetanusz toxoiddal immunizált BALB/C-egerek lépsejtjeinek és P3+-X63-Ag8.653 jelű, egéredetű mielómasejtvonal sejtjeinek fuzionálásával lett előállítva. Ez a P3 MAb erősen reagál N-glikolilezett szíálsavat tartalmazó gangliozidokkal, de acetilezett gangliozidokat vagy neutrális glikolipideket nem ismer fel. Jóindulatú és neopláziás sejtvonalakon és szöveteken végzett immuncitokémiai és immun-hisztokémiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a P3 MAb felismer emlőrákot [Vázquez és mtsai.: „Generation of murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids”, *Hybridoma* 14, 551 (1995)] és melanómát.

A P3 MAb anti-idiotípus immunválaszt (Ab2) indukált BALB/C-egerekben (szingén modellben) adjuváns és hordozóprotein alkalmazása nélkül is [Vázquez és mtsai.: „Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody” *Hybridoma* 17, 527 (1998)]. Immunkémiai vizsgálatok arra utaltak, hogy ezen ellenanyag antigénfelismerő sajátosságában szíálsav (gangliozidok esetében) és SO₃⁻ (szulfatidok esetében) elektronegativ csoportok játszanak szerepet [Moreno és mtsai.: „Delineation of epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides” *Glycobiology* 8, 659 (1998)].

Az 1E10 jelű, idiotípus elleni MAb-ot szekretáló sejtvonalat (Mabai 1E10) KLH hordozóproteinhez kapcsolt P3 MAb-al immunizált BALB/C-egérből állítottuk elő [US 6 063 379 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, a sejtvonal nyilvántartási száma: ECACC 97112901]. A Mabai 1E10 ellenanyag fajlagosan felismerte a P3 MAb-ot, de nem kötött más, gangliozid elleni IgM-ellenanyagokat. Ezen túlmenően, a Mabai 1E10 gátolta a MAb P3 fajlagos kötődését GM3(NeuGc)-gangliozidhoz és az MDA-MB-435 jelű, ductális emlőkarcinóma eredetű sejtvonalhoz (amely P3 MAb kötésre nézve pozitív). Szingénes vagy allogénes egérmódelbe adva, a Mabai 1E10 erős Ab3-ellenanyag-választ indukált, ezen Ab3-ellenanyagok azonban nem mutattak a P3 MAb-hal azonos specificitást, az esetben sem, ha az Ab1-ellenanyagéhoz hasonló idiotípust hordoztak [Vázquez és mtsai.: “Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody”, *Hybridoma* 17, 527 (1998)]. A Mabai 1E10 erős tumorelleses hatást indukált szingénes, valamint allogénes egerekben. BALB/C-egerekben az F3H jelű emlőkarcinóma sejtvonal növekedése jelentősen lelassult Freund-adjuvánnal elegyített, KLH-proteinhez kapcsolt Mabai 1E10 ellenanyaggal történő ismételt vakcinázást követően. A vakcinázást követően a spontán tüdőmetasztázisok száma is csökkent. C57BL/6-egerekben a Mabai 1E10-ellenanyag intravénás beadását követően, amelyet 10-14 nappal B16-melanómasejtek intravénás inokulációja után adtunk be, a tüdőmetasztázisok számának drámai csökkenését váltotta ki, irreleváns IgG-vel kezelt egerek csoportjával összehasonlítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tumorelleses hatás több mechanizmusa aktiválódott [Vázquez és mtsai.: “Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides”, *Oncol. Rep.* 7, 751 (2000)].

Annak ellenére, hogy a hibridóma eljárást 15 éve fejlesztették ki [Köhler és Milstein: “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”, *Nature* 256, 495 (1975), és hogy a monoklonális ellenanyagokat alkalmazzák diagnosztikában és kutatásban, nem bizonyították terápiás hatékonyságukat az emberi szervezetben. Ennek oka főleg az, hogy felezési idejük a vérben igen rövid, hogy az egerek effektorfunkciói nem működnek az emberi immunrendszerben, valamint hogy az egéredetű ellen-



anyagok ellen humán immunválasz indukálódik ("human anti-mouse antibody", HAMA válasz).

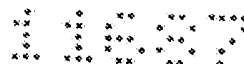
Egyébként, a molekuláris biológiai eljárások forradalmasították a MAb-ok alkalmazásának a lehetőségét, mivel az immunglobulin-gének manipulálása révén lehetővé vált csökkentett antigenitású, módosított ellenanyagok előállítása, valamint azok effektorfunkcióinak javítása bizonyos kórképek kezelése vagy diagnosztizálása céljából. Az immunglobulinok immunogenitásának a mérséklésére alkalmas eljárások elsődleges célja úgy csökkenteni egéredetű ellenanyagok és humán eredetű immunglobulinok közötti különbségeket, hogy az antigén-felismerő specifitás változatlan maradjon [Morrison és Oi: "Genetically engineered antibody molecules", Adv. Immunol. 44, 65 (1989)].

Újabban számos eljárást fejlesztettek ki egér- vagy patkány eredetű ellenanyagok humanizálására, és ezáltal mérsékelni az egyénekbe injektált idegen proteinek ellen kialakuló xenogén immunválaszt. Az antigenitás csökkentése érdekében elsők között alkalmazott eljárás kiméra ellenanyagok alkalmazása volt, amely ellenanyagokban az egéredetű protein variábilis doménjeit humán eredetű molekulák konstans doménjeibe inszertálták, és az így létrejött termékek változatlan specifitást, de egéredetű megfelelőjükhöz képest csökkentett immunogenitást mutatnak, továbbá megtartják humán effektorfunkcióikat [Morrison és mtsai.: "Chimeric human antibody molecules: Mouse antigenbinding domains with human constant region domains", Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 81, 6851 (1984)]. Az esetben is, ha a kiméra ellenanyag azonos specifitást mutat, mint egéredetű megfelelője, gyakran észlelhető a rágszáló eredetű variábilis régiók elleni immunválasz.

Hogy tovább csökkentsék a kiméra ellenanyagok immunogenitását, a rágszáló eredetű monoklonális ellenanyagból csak komplementaritást meghatározó régiókat (complementarity determining region", CDR) vitték át a humán eredetű vázrégiókba, és ezt a hibrid variábilis régiót expresszáltatták együtt a humán eredetű konstans régiókkal [Jones és mtsai.: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse", Nature 321, 522 (1986); Verhoeyen és mtsai.: "Reshaping human antibodies: grafting an antilysozym activity", Science 239, 1534 (1988)]. Ennek az eljárásnak azonban számos korlátja van: az így előállított ellenanyag gyakran mutat csökkentett affinitást, és a keret számos elemét kell visszamutatni a megfelelő egéredetűre ahhoz, hogy a kötődési tulajdonság helyreálljon [Reichmann és mtsai.: "Reshaping human antibodies for therapy", Nature 332, 323 (1988); Queen és mtsai.: "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor", Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 86, 10029 (1989); Tempest és mtsai.: "Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncycial virus infection *in vivo*", Biotechnology 9, 266 (1991)]. Ezen túlmenően, CDR-beültetett ellenanyagok esetében gyakran észleltek perszisztáló immunogenitást.

Mateo és munkatársai (US 5 712 120 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) eljárást írnak le egéredetű ellenanyagok immunogenitásának csökkentésére. Az általuk leírtak szerint, a módosítások a kiméra ellenanyagok variábilis régióira, és elsősorban az egéredetű FR-régiókra korlátozódtak. Ezen túlmenően, a helyettesítéseket az FR-régiók kizárólag azon részeiben végezték el, amelyek amfipátiás szekvenciákat tartalmaztak, és ezért T-sejtek által felismerhető, potenciális epitópoknak minősültek. A fenti eljárás szerint, néhány, a potenciálisan immunogén epitópokban található aminosavat célzottan a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvencia megfelelő aminosavaira cserélnek, viszont azokat az aminosavakat, amelyek a kanonikus szerkezetért leginkább felelősek, valamint a CDR-régiók közvetlen szomszédságában vannak, vagy a Vernier-zónában található, megtartják.

Az így előállított ellenanyagok megtartják antigénkötő tulajdonságaikat és kevésbé immunogének, mint egéredetű vagy kiméra elődeik [Mateo és mtsai.: "Removal of T cell epitopes from genetically engineered



antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity”, *Hybridoma* 19, 463 (2000)], és ezek a tulajdonságok növelik terápiás értéküket. Az eljárás szerint csak néhány mutációt, és kevesebb genetikai manipulációt kell végezni.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány lényegét. A találmány tárgyát molekuláris biológiai eljárásokkal előállított rekombináns ellenanyagok képezik. Közelebbről, a találmány tárgyát a P3 monoklonális ellenanyagból származtatott kíméra ellenanyag képezi, amelyet az ECACC gyűjteményében 94113026 nyilvántartási számon letétbe helyezett hibridóma szekretál. A P3 MAb emlőtumorsejteken és melanómasejteken expresszáldott antigént ismer fel. A P3 MAb-ellenanyag nehéz- és könnyűláncainak hipervariábilis régiói (CDR-régiói) az alábbi szekvenciákat tartalmazzák:

10 nehézlánc:
CDR1: RYSVH;
CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS;
CDR3: SGVREGRAQAWFAY;

könnyűlánc:
15 CDR1: KASQDVSTAVA;
CDR2: SASYRYT;
CDR3: QQHYSTPWT.

Előnyösen, a nehéz- és könnyűláncok FR-régiók az alábbi szekvenciákat tartalmazzák:

nehézlánc:
20 FR1: QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLG;
FR2: WVRQPPGKGLEWLG;
FR3: RLSISKDNSKSKVFLKMNSLQTTDDTAMYYCAR;
FR4: WGQGTLV;

könnyűlánc:
25 FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC;
FR2: WYQQKPGQSPKLLIY;
FR3: GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYC;
FR4: FGGGTKL.

Előnyösen, a találmány szerinti kíméra ellenanyag tartalmazza a humán eredetű IgG1 nehézlánc konstans régióját, valamint a humán eredetű C κ könnyűlánc konstans régióját. Más nézőpontból, a találmány tárgyát képezi az ECACC gyűjteményében 94113026 számon letétbe helyezett hibridómasejtvonal által szekretált P3 MAb-ból származtatott humanizált ellenanyag, amelyre jellemző, hogy humán eredetű IgG1 nehézlánc konstans régiót és humán eredetű C κ könnyűlánc konstans régiót tartalmaz, és a könnyűlánc FR-régiói az alábbi pontmutációk valamelyikét tartalmazzák:

35 könnyűlánc:
a 8. pozícióban: His helyett Pro;
a 9. pozícióban: Lys helyett Ser;
a 10. pozícióban: Phe helyett Ser;
a 11. pozícióban: Met helyett Leu; és/vagy
40 a 13. pozícióban: Thr helyett Ala.

A találmány tárgyát képezi továbbá az ECACC gyűjteményében 97112901 nyilvántartási számon letétbe helyezett hibridóma sejtvonala által szekretált 1E10 monoklonális ellenanyagból (MABai 1E10) származtatott kíméra ellenanyag, amely a P3 MAb-ellenanyagot felismerő anti-idiotípus ellenanyag. A MABai 1E10-ellenanyag a nehéz- és könnyűlánc hipervariábilis régiókban (CDR-regiókban) az alábbi szekvenciákat tartalmaz:

5 nehézlánc:

CDR1: SYDIN;

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG;

CDR3: EDYYDNSYFFDY;

könnyűlánc:

10 CDR1: RASQDISNYLN;

CDR2: YTSRLHSG;

CDR3: QQGNTLPWT.

Előnyösen, a nehéz- és könnyűláncok FR-szekvenciái az alábbiak:

nehézlánc:

15 FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT;

FR2: WVRQRPEQGLEWIG;

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSLRTSEDSAVYFCAR;

FR4: WGQGTTLTV;

könnyűlánc:

20 FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVITSC;

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY;

FR3: VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC;

FR4: FGGGTKLESK.

Előnyösen, a találmány szerinti kíméra ellenanyag humán eredetű IgG1 nehézlánc konstans régióját és
25 humán eredetű C κ könnyűlánc konstans régióját tartalmazza. Az említettek felül, a találmány tárgyát képezi az ECACC gyűjteményében 97112901 nyilvántartási számon letétbe helyezett hibridóma által szekretált 1E10 MAb-ellenanyagból származtatott humanizált ellenanyag, amely humán eredetű IgG1 nehézlánc konstans régiót és humán eredetű C κ könnyűlánc konstans régiót tartalmaz, továbbá a nehéz- és könnyűláncok FR-regiói az alábbi pontmutációk bármelyikét tartalmazzák:

30 könnyűlánc:

a 7. pozícióban: Thr helyett Ser;

a 8. pozícióban: Thr helyett Pro;

a 15. pozícióban: Leu helyett Val;

nehézlánc:

35 az 5. pozícióban: Gln helyett Val

a 40. pozícióban: Arg helyett Ala

a 42. pozícióban: Glu helyett Gly

a 87. pozícióban (Kabat féle számozás szerint 83. pozícióban): Thr helyett Arg.

Más nézőpontból, a találmány tárgyát képezi a fenti kíméra és humanizált ellenanyagokat expresszáló
40 sejtvonala, továbbá az ellenanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmények.



A találmány tárgyát képezik a fenti ellenanyagokat és megfelelő vivőanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmények az emlő, tüdő, emésztő rendszer és urogenitális rendszer tumorainak, valamint melanómák, szarkómák, neuroektodermális tumorok és áttétek, valamint kiújulásaik kezelésére.

Más megközelítés szerint, a találmány szerinti ellenanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmények alkalmazhatók az emlő, tüdő, emésztő rendszer és urogenitális rendszer tumorainak, valamint melanómák, szarkómák, neuroektodermális tumorok és áttétek, valamint kiújulásaik *in vivo* lokalizálására és diagnosztizálására.

A P3 MAb- és MAbai 1E10-ellenanyagok variábilis régióinak cDNS-szintézise és génamplifikációja PCR-eljárással

Citoplazma-RNS-t extraháltunk körülbelül 10^6 P3 (GM3 N-glikolilezett gangliozid elleni, egérszervi, IgM izotípusú monoklonális ellenanyag) vagy 1E10 (a P3 idiotípusa elleni monoklonális ellenanyag) hibridómasejtjéből. Az RNS-t TRIZOL (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) reagens alkalmazásával extraháltuk, a gyártó utasításai szerint eljárva. A cDNS-szintézis reakciót úgy végeztük, hogy elegyítettünk az alábbiakat: 5 μ g RNS, 25 pmól/l Vh (komplementer a VH-P3 egérszervi IgM konstans régióval, és a VH-1E10 egérszervi IgG1 konstans régiójával) vagy Vk (komplementer mindkét ellenanyag egérszervi kappa konstans régiójával) reagens, 2,5 mmól/l mindegyik dNTP-reagensből, 50 mmól/l Tris-HCl pH 7,5, 75 mmól/l KCl, 10 mmól/l DTT, 8 mmól/l MgCl₂ és 15 egység RNáz inhibitor, 50 μ l reakcióelegyben. Az elegyet 70°C-ra hevítettük 10 percre, majd lassan 37°C-ra hűtöttük. Ezt követően, az elegyhez 100 egységnyi MLV reverz transzkriptázt adtunk, majd az inkubálást 42°C-on folytattuk egy órán át.

A VK és VH variábilis régió cDNS-eket amplifikáltuk PCR-eljárással. Röviden, 5 μ l VH vagy VK eredetű cDNS-t elegyítettünk 25 pmól/l specifikus lánccindító oligonukleotiddal, mindegyik dNTP 1,5 mmól/l koncentrációjával, 5 μ l 10-szer tömény pufferben oldott, 1 egység Taq DNS-polimeráz enzimmal. A mintákat 25 hőciklusnak tettük ki, az alábbi paraméterek mellett: 94°C, 30 másodperc, 50°C, 30 másodperc, 72°C, 1 perc, majd egy utolsó inkubálás 5 percen át, 72°C-on.

Amplifikált cDNS klónozása és szekvenálása

A (P3 és 1E10) VH és VK PCR-termékeket TA-vektorba (TA Cloning kit, Promega, USA) klónoztuk. A kapott klónokat a didezoxi-eljárással szekvenáltuk, T7 DNS-polimeráz alkalmazásával (T7 szekvenáló készlet, Pharmacia, Svédország).

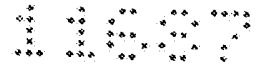
Kiméra gének konstruálása

A VH- és VK-géneket enzimátikus emésztéssel kivágtuk a TA-vektorokból, és a megfelelő expressziós vektorokba klónoztuk [Coloma és mtsai.: „Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction”, J. Immunol. Methods 152, 89 (1992)].

A VH-gént EcoRV- és NheI-enzimokkal történő emésztéssel a TA-vektorból kivágtuk, és olyan expressziós vektorba (PAH 4604) klónoztuk, amely humán eredetű IgG1 variábilis régió gént és hisztidínoil rezisztenciagént tartalmaz. Így kaptuk a P3VH-PAH4604- és 1E10VH-PAH4604-konstrukciókat. A VK-gént EcoRV- és SalI-enzimokkal történő emésztéssel vágtuk ki a TA-vektorból és expressziós vektorba (PAG4622) klónoztuk. Ez a vektor mikofenolsav rezisztenciagént és humán eredetű kappa konstans régió gént tartalmaz. Így kaptuk a P3VK-PAG4622- és 1E10VK-PAG4622-konstrukciókat.

P3 MAb- és MAbai 1E10-ellenanyagokból előállított kiméra ellenanyagok expresszáltatása

NS-0-sejtekbe elektroporáltunk 10 μ g P3VK-PAG4622- vagy 1E10-PAG4622-konstrukciót, és a humán eredetű kappa könnyűláncot expresszáló klónokat transzfektáltuk 10 μ g P3VH-PAH4604- vagy 1E10VH-



PAH4604-konstrukcióval.

A DNS-eket PvuI-enzimmel történő emésztéssel linearizáltuk, etanollal kicsaptuk, majd 50 µl PBS-ben oldottuk. Körülbelül 10^7 sejtet gyűjtöttünk össze centrifugálással, és az emésztett DNS-sel elegyítve 0,5 ml PBS-sel elektroporációs küvetába reszuszpendáltuk. Tíz perces jégen tartást követően a sejtekkel 200 Volt, és 960 µF elektrosztatikus kapacitás mellett egy impulzust közöltünk, majd azokat jeges fürdőben tartottuk további 10 percre. A sejteket 96 lyukú tenyésztőlemezekre osztottuk szét, 10% főtális borjúsérummal (FCS) kiegészített DMEM F12-tápközegben. Két nap elteltével, a lyukakhoz szelektív tápközeget adtunk (a megfelelő lemezekre 0,45 µg/ml mikofenolsavval, illetve 10 mmól/l hisztidinollal kiegészített DMEM F12 FCS). A transzfektált klónok 14 nap elteltével szabad szemmel észlelhetők voltak.

A transzfektált klónokat tartalmazó lyukak felülúszójában a humán eredetű ellenanyag jelenlétét ELISA-vizsgálattal mutattuk ki. Mikrotitráló lemezeket érzékenyítettünk humán eredetű kappa könnyülánc elleni (humán eredetű kappa-láncot szekretáló klónok kimutatására) vagy humán eredetű IgG elleni (gammaláncra specifikus) (teljes ellenanyagot szekretáló klónok kimutatására) kecskeeredetű ellenanyagokkal. PBST-pufferrel (0,05% Tween 20-reagenssel kiegészített foszfát-pufferes fiziológiás konyhasóoldat) történő mosást követően, a transzfektánsokat tartalmazó lyukakból származó felülúszók hígításait mértük be a mikrotitrálólemez egyes lyukaiba 1 órára, 37°C-on. A lemezeket PBST-pufferrel mostuk, majd azokhoz tormaperoxidázzal jelölt, kecskeeredetű, humán kappa könnyülánc elleni (kappa-lánc-specifikus), vagy alkalikus foszfátazzal jelölt, kecskeeredetű, humán IgG elleni (gammalánc-specifikus) reagenst adtunk, és 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A lemezeket újra mostuk PBST-pufferrel, majd azokhoz o-feniléndiamin vagy p-nitrofenilfoszfát reagenseket tartalmazó szubsztrátot adtunk. Fél óra múlva mértük a 492 nm vagy 405 nm hullámhosszon észlelt fényelnyelést.

P3hu és 1E10hu jelű humanizált ellenanyagok előállítására T-sejt-epitópok humanizálásával, T-sejt-epitópok kikövetkeztetése

A P3 és 1E10 variábilis domének szekvenciáját AMPHI-algoritmus alkalmazásával vizsgáltuk [Margalit és mtsai.: "Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence", J. Immunol. **138**, 2213 (1987)]. A program 7 vagy 11 aminosavból álló, helikális amfipátiás szegmentumokat keres, amelyek T-sejtes immunogenitással hozhatók összefüggésbe. Az alkalmazott SOHHA-program szintén potenciális helikális hidrofób szegmentumokat mutat ki [Elliot és mtsai.: "An hypothesis on the binding of an amphipathic, alpha helical sequence in li to the desotope of class II antigen", J. Immunol. **138**, 2949 (1987)]. Mindkét algoritmus előre valószínűsítette, hogy a P3- és 1E10-ellenanyagok variábilis régió szekvenciájának mely szegmensei prezentálódhatnak T-helper sejtek számára MHC II-molekulákkal összefüggésben.

Homológia-keresés humán immunglobulinokkal

Az egéredetű variábilis régiók aminosav-szekvenciáit (a világhálón hozzáférhető) GeneBank és EMBL adatbázisokban szereplő immunglobulin-szekvenciákkal hasonlítottuk össze. Az egéredetű szekvenciákkal a legnagyobb fokú homológiát mutató humán variábilis régió szekvenciákat határoztuk meg az egyes ellenanyagok számára. A szekvencia-homológia kimutatására a PC-TWO HIBIO PROSIS 06-00 programcsomagot alkalmaztuk.

Csökkent immunogenitás kimutatása

Az eljárás célja az immunogenitás csökkentése, vagyis potenciális immunogén T-sejt-epitópok kiküszöbölése vagy humanizálása, minimális változtatások árán. Az eljárás során tudatosan kicserélünk néhány, helikális amfipátiás szegmentumban rendeződött aminosavcsoportot. Azon aminosavakat, amelyek leginkább



felelősek a kanonikus struktúráért, valamint a CDR-szekvenciák közvetlen szomszédságában, illetve a Vernier-zónában helyezkednek el, érintetlenül kell hagyni.

Az eljárás szerint, az egéredetű variábilis régiókat az azzal legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciával hasonlítottuk össze, majd azonosítottuk az egéredetű MAb és az azzal legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvencia minden egyes pozíciójában az eltéréseket, úgy, hogy csak az FR-szegmentum aminosavait vettük figyelembe [Kabat.: "Sequences of proteins of immunological interest", 5. Kiadás, National Institute of Health, USA]. Az így meghatározott aminosavakat az egéredetű szekvenciákkal legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvencia azonos pozíciójában található aminosavakkal helyettesítettük. A cseréket irányított mutagenézis eljárással végeztük.

A kötőhely háromdimenziós struktúrájának kialakításában résztvevő aminosavakat nem mutáltattuk, mivel az érintheti az antigénfelismerést. A helyettesítések harmadlagos struktúrára kifejtett hatásáról további információt kaphatunk az antigénkötő hely molekuláris modellezésével.

Megjegyzendő azonban, hogy a helikális amfipátias szegmentumban prolin aminosavak vannak jelen, valamint azt, hogy bizonyos egéredetű aminosavak nem tűnnek fel ugyanabban a pozícióban az azzal legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciában, viszont gyakoriak lehetnek más humán eredetű immunoglobulinokban. Ezért, az egyes vázregió-pozíciókra nem adható meg egyetlen aminosav, amellyel az egéredetű aminosavak helyettesítendők. A mutációkat átfedő PCR-eljárással végeztük.

A P3hu és 1E10hu humanizált ellenanyagok klónozása és expresszáltatása

A P3hu- és 1E10hu-ellenanyagoknak megfelelő gékonstrukciókat expressziós vektorokban klónoztuk a kíméra ellenanyagok esetében már ismertetett eljárással. Így kaptuk a P3VKhu-PAG4622- vagy 1E10VKhu-PAG4622- és P3VHhu-PAH4604- vagy 1E10VHhu-PAH4604-konstrukciókat.

A rekombináns ellenanyagok tisztítása

A rekombináns ellenanyagokat protein A affinitásos kromatográfiával (Pharmacia, Uppsala, Svédország) tisztítottuk.

Biológiai aktivitás

A rekombináns ellenanyagok biológiai aktivitását antigénhez történő fajlagos kötődésüknek ELISA-eljárással végzett mérésével határoztuk meg.

A P3 rekombináns MAb esetében, mikrotitráló lemezeket metanolban oldott GM3(NeuGc)-gangliozidokkal érzékenyítettünk. Egy óra szárítást követően, a nem specifikus kötődést szarvasmarha-eredetű szérumalbuminnal (BSA) blokkoltuk (1% BSA-t tartalmazó Tris-HCl pufferben), 1 órán át, 37°C-on. A lemezeket PBS-sel mostuk, majd tisztított, rekombináns P3 MAb-al inkubáltuk, 1 órán át, 37°C-on. A lemezeket Tris-HCl-pufferrel mostuk, majd 1 órán át, 37°C-on, alkalikus foszfátázal konjugált, humán ellenanyagra fajlagos, kecskeeredetű reagenssel inkubáltuk. Végül, a lemezeket mostuk, és p-nitrofenilfoszfát reagenst tartalmazó szubsztrátpufferrel inkubáltuk. A fényelnyelést fél óra elteltével, 405 nm hullámhosszon mértük.

A rekombináns MAbai 1E10 esetében hasonló eljárást alkalmaztunk, azzal az eltéréssel, hogy a lemezeket P3 MAb-bal érzékenyítettük, és a mosásokat 0,05% Tween 20-t tartalmazó PBS-pufferrel végeztük.

Hacsak kifejezetten másképp nem kötjük ki, a példákban ismertetett kísérletekben alkalmazott valamennyi enzim, reagens és eszköz kereskedelemben hozzáférhető forrásból származott

1. példa

Kíméra P3 MAb előállítás



A cDNS-t reverz transzkriptáz enzimmal szintetizáltuk, a P3 MAb-ellenanyagot szekretáló hibridómából származó RNS-ből kiindulva, a fentiekben már ismertettek szerint. A reakció során alkalmazott láncindító oligonukleotidok a következő szekvenciájúak voltak:

VH esetében:

5 5'AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC3';

VK esetében:

5'GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG3'.

A VHP3 és VKP3 cDNS-szakaszokat PCR-eljárással amplifikáltuk, Taq-polimerázt és specifikus láncindító oligonukleotidokat alkalmazva. A láncindító oligonukleotidokba épített restriktációs enzim felismerő helyek VH esetében EcoRV és NheI, VK esetében EcoRV és Sall voltak. Az alábbi láncindító oligonukleotid-szekvenciákat alkalmaztuk:

VH esetében:

1. láncindító oligonukleotid (szignálpeptid):

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT_(CG)CTCTT3'

15 2. láncindító oligonukleotid (CHI):

5'GGGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT3'

VK esetében:

1. láncindító oligonukleotid (szignálpeptid):

5'GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT_(GA)T3'

20 2. láncindító oligonukleotid (CK):

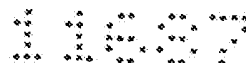
5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTCCA(GA)CTT(GT)_GTCCC3'.

A PCR-termékeket TA-vektorba (TA klónozó készlet, Invitrogen) klónoztuk. Tizenkét, egymástól független klónt szekvenáltunk didezoxi-eljárással, „T7 DNA Pol” (Pharmacia) reagenskészlet alkalmazásával. Homológiakereső elemzéssel meghatároztuk a VHP3 és VKP3 legnagyobb fokú homológiát mutató szekvenciáit. A VHP3- és VKP3-szekvenciák (1. és 2. ábrák) a Kabat féle osztályozás szerinti nagyfokú homológiát mutatnak az IB- és V-szekvenciákkal.

Miután a VHP3-t EcoRV- és NheI- enzimekkel, a VKP3-t EcoRV és Sall restriktációs enzimekkel emésztettük, a VHP3- és VKP3-fragmentumokat előzőleg ugyanezen enzimekkel emésztett PAH4604 (VH esetében) és PAG4622 (VK esetében) expressziós vektorokba klónoztuk. Ezeket az expressziós vektorokat Sherie Morrisontól (UCLA, Kalifornia, USA) kaptuk, és azok alkalmasak immunglobulinok expresszálatására emlőssejtekben. A PAH4604 a humán eredetű IgG1 konstans régiót tartalmazza, a PAG 4622 humán (kappa konstans régió gént tartalmaz) [Coloma és mtsai.: “Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polimerase chain reaction”, *J. Immunol. Meth.* 152, 89 (1992)]. Így állítottuk elő a P3VH-PAH4604- és P3VK-PAG4622-konstrukciókat.

35 Tíz (10) µg P3VK-PAG4622-konstrukciót NS-0-sejtekbe elektroporáltunk, és humán eredetű kappakönnyűláncot expresszáló egyik klónt transzfektáltuk 10 µg P3VH-PAH4604-konstrukcióval. A transzfekciót megelőzően, a DNS-eket mindkét esetben PvuI-enzimmal történő emésztéssel linearizáltuk, etanollal kicsaptuk, majd 50 µl PBS-ben oldottuk.

40 Körülbelül 10^7 sejtet gyűjtöttünk össze centrifugálással, és 0,5 ml PBS-ben szuszpendálva, az emésztett DNS-sel együtt elektroporációs küvettába mértük. Miután a sejteket 10 percig jégen tartottuk, a sejtekkel egyet-



len impulzust közöltünk 200 Volt, és 960 μ F elektrosztatikus kapacitás mellett, majd azokat jeges firdőben tartottuk további 10 percre. A sejteket 96 lyukú tenyésztőlemezre osztottuk szét, 10% főtális borjúsérummal (FCS) kiegészítet DMEM F12-tápközegben. Két nap elteltével, a lyukakhoz szelektív tápközeget adtunk (a megfelelő lemezre 0,45 μ g/ml mikofenolsavval, illetve 10 mmól/l hisztidinollal kiegészített DMEM F12 FCS). A transzfektált klónok 14 nap elteltével szabad szemmel észlelhetők voltak.

A transzfektált klónokat tartalmazó lyukak felülúszójában a humán eredetű ellenanyag jelenlétét ELISA-vizsgálattal mutattuk ki. Mikrotitráló lemezeket érzékenyítettünk humán eredetű kappa könnyűlánc elleni (humán eredetű kappa-láncot szekretáló klónok kimutatására) vagy humán eredetű IgG elleni (gammaláncra specifikus) (teljes ellenanyagot szekretáló klónok kimutatására) kecskeeredetű ellenanyagokkal. PBST-pufferrel (0,05% Tween 20 reagenssel kiegészített foszfát-pufferes fiziológiás konyhasóoldat) történő mosási követően, a transzfektánsokat tartalmazó lyukakból származó felülúszók hígításait mértük be a mikrotitrálólemez egyes lyukaiba, és azt 1 óráig, 37°C-on inkubáltuk. A lemezeket PBST-pufferrel mostuk, majd azokhoz tormaperoxidázzal jelölt, kecskeeredetű, humán kappa könnyűlánc elleni (kappa-lánc specifikus), vagy alkalikus foszfátázzal jelölt, kecskeeredetű, humán IgG elleni (gammalánc specifikus) reagenst adtunk, és 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A lemezeket újra mostuk PBST-pufferrel, majd azokhoz o-feniléndiamin vagy p-nitrofenilfoszfát reagenseket tartalmazó szubsztrátot adtunk. Fél óra múlva mértük a 492 nm vagy 405 nm hullámhosszon észlelt fényelnyelést.

2. példa

A P3 humanizált ellenanyag különböző változatainak előállítás

Az egéredetű VHP3- és VKP3-szekvenciákat (1. és 2. ábrák) humán eredetű szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A 3. és 4. ábrák a legnagyobb fokú homológiát mutató szekvenciákat mutatják. Helikális, amfipatiás régiókat, vagy potenciális T-sejt-epitópokat kerestünk az egéredetű P3 variábilis régió szekvenciákban, és tudatos stratégiát dolgoztunk ki arra, hogy aminosav-helyettesítésekkel a potenciális T-sejt-epitópokat az egéredetű szekvenciákban kiküszöböljük vagy humanizáljuk.

A VHP3 elemzése (3. ábra) 2 amfipatiás szegmentum jelenlétét igazolta, amelyek közül az első tartalmazza a CDR1- és FR2-régiókat, valamint a CDR2-régió néhány aminosavát, a második tartalmazza az FR3-végét és a CDR3-régiót. Az egéredetű szekvencia és az azzal a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvencia közti jelentősebb eltérések a CDR-régiókban, vagy a kötőhely háromdimenziós szerkezetének kialakításában résztvevő pozíciókban helyezkedtek el. Ennek megfelelően úgy határoztunk, hogy az egéredetű VHP3-szekvenciában nem cserélünk ki aminosavakat.

A VKP3 elemzése szintén 2 amfipatiás szegmentum jelenlétét igazolta (4. ábra), melyek közül az első tartalmazta az FR1-régiót, a második a CDR2-régiót, valamint az FR3-régió néhány aminosavát. Úgy határoztunk, hogy a 8., 9., 10., 11. és 13. pozíciókban található aminosavakat cseréljük ki a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvencia azonos pozícióját elfoglaló aminosavakra. A His, Lys, Phe, Met és Thr aminosavakat, a fenti a sorrendben, Pro, Ser, Ser, Leu és Ala aminosavakra cseréltük. A cseréket átfedő PCR-eljárással [Kamman és mtsai.: "Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)", Nucleic Acid Res. 17, 5404 (1989)] végeztük, az 1., 2., 3. és 4. jelzésű, alábbi szekvenciájú láncindító oligonukleotidok alkalmazásával:

1. láncindító oligonukleotid:

5'ATGACCCAGTCTCCTTCTTCTCTTCCGCGTCAGTAGGAGAC3';

2. láncindító oligonukleotid:

5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC3';

3. láncindító oligonukleotid:

5'GTCTCCTACTGACGCGGAAAGAGAAGAAGGAGACTGGGTCAT3';

5

4. láncindító oligonukleotid:

5'GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)T3'.

A pontmutációkat szekvenálással ellenőriztük. Az így előállított konstrukció a P3VKhu volt, amelyet PAG4622 expressziós vektorba klónoztunk. A klónozás eredménye a P3VKhu-PAG4622-konstrukció lett. A humanizált ellenanyag expresszáltatása érdekében, a P3VHhu-PAH4604- és P3VKhu-PAG4622-konstrukciókkal NS-0-sejteket transzfektáltunk. A P3hu-ellenanyag transzfektálását a kiméra ellenanyagok esetében már ismertetett elektroporációs és kimutatási eljárás alkalmazásával végeztük.

3. példa

A kiméra P3 MAb-ellenanyag biológiai aktivitása

A kiméra P3 rekombináns ellenanyag biológiai aktivitását antigénhez történő fajlagos kötődésük ELISA-eljárással végzett mérésével határoztuk meg.

A P3 rekombináns MAb esetében, mikrotitráló lemezeket metanolban oldott GM3(NeuGc)-gangliozidokkal érzékenyítettünk. Egy órás szárítást követően, a nem specifikus kötődést szarvasmarha-eredetű szérumalbuminnal (BSA) blokkoltuk (1% BSA Tris-HCl pufferben), 1 órán át, 37°C-on. A lemezeket PBS-sel mostuk, majd 1 órán át, 37°C-on, tisztított, rekombináns P3 MAb-al inkubáltuk. A lemezeket Tris-HCl-pufferrel mostuk, majd 1 órán át, 37°C-on, alkalikus foszfátazzal konjugált, humán ellenanyagra fajlagos, kecskeeredetű reagenssel inkubáltuk. Végül, a lemezeket mostuk, és p-nitrofenilfoszfát reagenst tartalmazó szubsztrátpufferrel inkubáltuk. A fényelnyelést fél óra elteltével, 405 nm hullámhosszon mértük.

Negatív kontrollként kiméra TI MAb-ot alkalmaztunk.

Az 5. ábra kiméra P3 MAb antigénhez történő specifikus kötődését szemlélteti.

25

4. példa

Kiméra 1E10 MAb előállítása

A cDNS szintézisét reverz transzkriptáz enzimmal végeztük, a 1E10 MAb-ellenanyagot szekretáló hibridómából származó RNS-ből kiindulva, a fentiekben már ismertettek szerint. A reakcióban a következő szekvenciájú láncindító oligonukleotidokat alkalmaztuk:

30

VH esetében:

5'GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT3';

VK esetében:

5'CGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGGA3'.

A VH1E10 és VK1E10 cDNS-szakaszokat PCR-eljárással amplifikáltuk, Taq-polimeráz és specifikus láncindító oligonukleotidok alkalmazásával. Az alábbi láncindító oligonukleotid-szekvenciákat alkalmaztuk:

35

VH esetében:

1. láncindító oligonukleotid (szignálpeptid):

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT3';

2. láncindító oligonukleotid (CH1):

40

5'GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT3';

VK esetében:

1. láncindító oligonukleotid (szignál peptid):

5'GGGGTTAACCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)GCTCAG(CT)_T(CT)CT(TG)GG(GA)3';

2. láncindító oligonukleotid (CK):

5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTCCA(GA)CTT(GT)_GTCCC3'.

A PCR-termékeket TA-vektorba (TA klónozó készlet, Invitrogen) klónoztuk. Tizenkét (12) egymástól független klónt szekvenáltunk didezoxi-eljárással (lásd 7. és 8. ábra), „T7 DNA Pol” (Pharmacia) reagenskészlet alkalmazásával. Homológia kereső elemzéssel meghatároztuk a VH1E10 és VK1E10 legnagyobb fokú homológiát mutató szekvenciariészeit. A VH1E10- és VK1E10-szekvenciák nagyfokú homológiát mutatnak a vegyes és V szekvenciákkal, a Kabat féle osztályozás szerint.

Miután a VH1E10-szekvenciát EcoRV és NheI, a VK1E10-szekvenciát HincII és Sall restriktions enzimekkel emésztettük, a VHP3- és VKP3-fragmentumokat az előzőleg megfelelő enzimekkel emésztett PAH4604 (VH esetében) és PAG4622 (VK esetében) expressziós vektorokba klónoztuk. Ezeket az expressziós vektorokat Sherie Morrison-tól (UCLA, Kalifornia, USA) kaptuk, és azok alkalmasak immunglobulinok expresszálatására emlőssejtekben. A PAH4604-vektor a humán eredetű IgG1 konstans régiót tartalmazza, a PAG4622 humán kappa konstans régió gént tartalmaz [Coloma és mtsai.: "Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polimerase chain reaction" J. Immunol. Meth. 152, 89 (1992)]. Így állítottuk elő a 1E10VH-PAH4604- és 1E10VK-PAG4622-konstrukciókat.

Tíz (10) µg 1E10VK-PAG4622-konstrukciót elektroporációval NS-0-sejtekbe juttattunk, és humán eredetű kappa könnyűláncot expresszáló klónt 10 µg 1E10VH-PAH4604-konstrukcióval transzfektáltunk. A transzfekciót megelőzően, a DNS-eket mindkét esetben PvuI-enzimmal történő emésztéssel linearizáltuk, etanollal kicsaptuk, majd 50 µl PBS-ben oldottuk.

Körülbelül 10^7 sejtet gyűjtöttünk össze centrifugálással, és az emésztett DNS-sel elegyítve 0,5 ml PBS-sel elektroporációs küvettaiba reszuszpendáltuk. Miután a sejteket 10 percig jégen tartottuk, azokkal 200 Volt, és 960 µF elektrosztatikus kapacitás mellett egy impulzust közöltünk, majd a sejteket további 10 percig jeges fürdőben tartottuk. A sejteket 96 lyukú tenyésztőlemezekre osztottuk szét, 10% főtális borjúsérummal (FCS) kiegészített DMEM F12-tápközegben. Két nap elteltével, a lyukakhoz szelektív tápközeget adtunk (a megfelelő lemezekre 0,45 µg/ml mikofenolsavval, illetve 10 mmól/l hisztidinollal kiegészített DMEM F12 FCS). A transzfektált klónok 14 nap elteltével szabad szemmel észlelhetők voltak.

A transzfektált klónokat tartalmazó lyukak felülűszójában a humán eredetű ellenanyag jelenlétét ELISA-vizsgálattal mutattuk ki. Mikrotitráló lemezeket érzékenyítettünk humán eredetű kappa könnyűlánc elleni (humán eredetű kappa-láncot szekretáló klónok kimutatására) vagy humán eredetű IgG elleni (gammaláncra specifikus)(teljes ellenanyagot szekretáló klónok kimutatására) kecskeeredetű ellenanyagokkal. PBST-pufferrel (0,05% Tween 20 reagenssel kiegészített foszfát-pufferes fiziológiás konyhasóoldat) történő mosást követően, a mikrotitráló lemez egyes lyukaiba a transzfektánsokat tartalmazó lyukakból származó felülűszók hígításait mértük be, és 1 óráig, 37°C-on inkubáltuk. A lemezeket PBST-pufferrel mostuk, majd azokhoz tormaperoxidázzal jelölt, kecskeeredetű, humán kappa könnyűlánc elleni (kappa-lánc-specifikus), vagy alkalikus foszfátázzal jelölt, kecskeeredetű, humán IgG elleni (gammalánc-specifikus) reagenst adtunk, és 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A lemezeket PBST-pufferrel újra mostuk, majd azokhoz o-feniléndiamin vagy p-nitrofenilfoszfát reagenseket tartalmazó szubsztrátot adtunk. Fél óra múlva mértük a 492 nm vagy 405 nm hullámhosszon észlelt fényelnyelést.

5. példa

Az IE10 humanizált ellenanyag különböző változatainak előállítása

Az egéredetű VHIE10- és VKIE10-szekvenciákat (6. és 7. ábrák) humáneredetű szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A 8. és 9. ábrákon az egéredetű szekvenciákkal legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciákat mutatjuk be. Az egéredetű IE10 variábilis régió szekvenciákban helikális, amfipatiás régiókat, vagy potenciális T-sejt-epitópokat kerestünk, és tudatos stratégiát dolgoztunk ki abból a célból, hogy a potenciális T-sejt-epitópokat az egéredetű szekvenciákban aminosav-helyettesítésekkel kiküszöböljük vagy humanizáljuk.

A VHIE10 elemzése (8. ábra) 3 amfipatiás szegmentum jelenlétét igazolta, amelyek közül az első az FR1-régiót, a második az FR2-régiót, a harmadik az FR3-régiót tartalmazza. Úgy határoztunk, hogy az 5., 40., 42. és 87. (Kabat féle számozás szerint 83.) pozícióban található aminosavakat az azzal legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvencia azonos pozíciójában található aminosavval helyettesítjük. A Gln, Arg, Glu és Thr aminosavakat – a fenti a sorrendben - Val, Ala, Gly és Arg aminosavakra cseréltük.

A helyettesítést átfedő PCR-eljárással végeztük [Kammann és mtsai.: „Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)”, *Nucleic Acids Res.*, 17, 5404 (1989)] különböző láncindítókészletek alkalmazásával.

A nehézlánc 5. pozíciójában az 1., 2., 3. és 4. jelzésű, alábbi szekvenciájú láncindítók alkalmazásával hoztunk létre mutációt:

1. láncindító:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCT3';

2. láncindító:

5'GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT3';

3. láncindító:

5'AGCTCCAGACTGCACCAGCTGAACCTG 3';

4. láncindító:

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT3'.

Miután az 5. pozícióban a pontmutáció létrejöttét szekvenálással ellenőriztük, a 40. és 42. pozícióban is mutációkat hoztunk létre.

A nehézlánc 40. és 42. pozíciójában a következő szekvenciájú láncindítókkal hoztunk létre mutációt:

1. láncindító:

5'TGGGTGAGGCAGGCCCTGGGCAGGGACTTGAG3';

2. láncindító:

5'GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT3';

3. láncindító:

5'CTCAAGTCCCTGCCAGGGCGCCTGCCTCACCCA3';

4. láncindító:

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT3'

Miután az 40. és 42. pozícióban a pontmutációk létrejöttét szekvenálással ellenőriztük, a 87 (Kabat szerint 83.) pozícióban is mutációt hoztunk létre.

A nehézlánc 87. (Kabat szerint 83.) pozíciójában a következő szekvenciájú láncindítók alkalmazásával

hoztunk létre mutációt:

1. láncindító:

5'CTCAGCAGGCTGCGGTCTGAGGACTCT3';

2. láncindító:

5'GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT3'

3. láncindító:

5'AGAGTCCTCAGACCGCAGCCTGCTGAG3';

4. láncindító:

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT3'.

Egyéb helyettesítéseket nem hajtottunk végre, mivel az aminosavak a kötőhely háromdimenziós struktúrájának kialakításában vettek részt.

A pontmutációk létrejöttét szekvenálással ellenőriztük. A kapott konstrukciót 1E10VHhu-konstrukciónak neveztük, és azt PAH4604 expressziós vektorba klónoztuk. Az így kapott konstrukciót 1E10VH-PAH4604-nek neveztük.

A VJ1E10 vizsgálata szintén 3 amfipátias szegmentum jelenlétét igazolta (9. ábra), ahol az 1. szegmentum FR1-, a második CDR1-, és a harmadik FR3-régiót foglalt magában. Úgy határoztunk, hogy a 7., 8. és 15. pozícióban található aminosavakat az egéredeti szekvenciával legnagyobb fokú homológiai mutató humán szekvencia azonos pozíciójában található aminosavakkal helyettesítettük. A Thr, Thr és Leu aminosavakat a Ser, Pro és Val aminosavakkal helyettesítettük. A helyettesítést átfedő PCR-eljárással végeztük [Kammann és mtsai.: „Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)”, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5404 (1989)] az 1., 2., 3. és 4. jelzésű, alábbi szekvenciájú láncindítók alkalmazásával.

A könnyűlánc 7., 8. és 15. pozíciójában a következő szekvenciájú láncindítók alkalmazásával hoztunk létre mutációt:

1. láncindító:

5'CAGATGACACAGTCTCCTTCTCCCTGTCTGCCTCTGTGG_GAGACAGAG_TC3';

2. láncindító:

5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC3';

3. láncindító:

5' GACTCTGTCTCCACAGAGGCAGACAGGGAGGAAGGAGACTGTGTCATCTG3';

4. láncindító:

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

A pontmutációk létrejöttét szekvenálással ellenőriztük. A kapott konstrukciót 1E10VKhu-konstrukciónak neveztük, és azt PAG4622 expressziós vektorba klónoztuk. Az így kapott konstrukciót 1E10VK-PAG4622-konstrukciónak neveztük.

Az 1E10 jelzésű humanizált ellenanyag expresszáltatásához NS-0-sejteket transzfektáltunk 1E10VHhu-PAH4604- és 1E10VKhu-PAG4622-konstrukciókkal.

Az 1E10 jelzésű ellenanyagot kódoló konstrukciókat a kiméra ellenanyagok esetében már ismertett elektroporációs és kimutatási eljárással transzfektáltuk.

6. példa

A kiméra Mab1E10-ellenanyag biológiai aktivitása

A kiméra Mab1E10-ellenanyag biológiai aktivitását antigénhez történő specifikus kötődése alapján, ELISA-eljárással vizsgáltuk.

A rekombináns 1E10 MAb esetében, mikrotitráló lemezeket P3 MAb-ellenanyaggal vontunk be. Miután a lemezt PBST-vel (0,05% Tween 20 reagenst tartalmazó foszfát-pufferes fiziológiás konyhasó-oldattal) mostuk, a nem specifikus kötődést oly módon blokkoltuk, hogy a lemezeket 1 órán át, 37°C-on, 1% szarvasmarha-eredetű szérumalbumint (BSA) tartalmazó PBST-pufferrel inkubáltuk. A lyukakat mostuk, és 1 óráig, 37°C-on, tisztított, rekombináns Mab1E10-ellenanyaggal inkubáltuk. A lyukakat PBST-pufferrel mostuk, és azokhoz kecskeeredetű, alkalikus foszfátázzal konjugált, humán ellenanyagra specifikus ellenanyagot adtunk, majd a lemezeket egy órán át, 37°C-on inkubáltuk. Végül, a lemezeket PBST-vel mostuk, és azokhoz p-nitrofenilfoszfát reagenst tartalmazó szubztrátpuffert adtunk. Fél óra elteltével 405 nm hullámhosszon mértük a fényelnyelést. Negatív kontrollként kiméra C5 MAb-ot alkalmaztunk. A 10. ábra kiméra 1E10 MAb specifikus kötődését mutatja P3 mAb-hoz.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán a VHP3-DNS szekvenciáját és az abból következtetett aminosav-szekvenciát mutatjuk be. A szekvenciákat Kabat számozása szerint rendeztük egymás mellé [Kabat és mtsai.: "Sequences of proteins of immunological interest", 5. Kiadás, National Institute of Health (1991)]. A CDR-régiókat pontozott vonallal jelöltük.

A 2. ábrán a VKP3-DNS szekvenciáját és az abból következtetett aminosav-szekvenciát mutatjuk be. A szekvenciákat Kabat számozása szerint rendeztük össze [Kabat és mtsai.: "Sequences of proteins of immunological interest", 5. Kiadás, National Institute of Health (1991)]. A CDR-régiókat pontozott vonallal jelöltük.

A 3. ábrán a VHP3-szekvenciát a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciával rendeztük össze. Az amfipatiás szegmentumokat aláhúzással, a CDR-régiókat vastag szedéssel emeltük ki.

A 4. ábrán a VKP3-szekvenciát a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciával rendeztük össze. Az amfipatiás szegmentumokat aláhúzással, a CDR-régiókat vastag szedéssel emeltük ki.

Az 5. ábrán a kiméra Mab P3 specifikus kötődését szemléltetjük GM3(NeuGc)-gangliozidhoz. Különböző koncentrációjú Mab P3-t és Mab T1-et (negatív kontroll) teszteltünk ELISA-eljárással. Mikrotitráló lemezeket vontunk be metanolban GM3(NeuGc)- és GM3(NeuAc)- (negatív kontroll) gangliozidokkal, és a specifikus kötődést meghatároztuk.

A 6. ábrán a VH1E10-DNS szekvenciáját és az abból következtetett aminosav-szekvenciát mutatjuk be. A szekvenciákat Kabat számozása szerint rendeztük egymás mellé [Kabat és mtsai.: "Sequences of proteins of immunological interest", 5. Kiadás, National Institute of Health (1991)]. A CDR-régiókat pontozott vonallal jelöltük.

A 7. ábrán a VK1E10-DNS szekvenciáját és az abból következtetett aminosav-szekvenciát mutatjuk be. A szekvenciákat Kabat számozása szerint rendeztük egymás mellé [Kabat és mtsai.: "Sequences of proteins of immunological interest", 5. Kiadás, National Institute of Health (1991)]. A CDR-régiókat pontozott vonallal jelöltük.

A 8. ábrán a VH1E10-szekvenciát a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciával rendeztük össze. Az amfipatiás szegmentumokat aláhúzással, a CDR-régiókat vastag szedéssel emeltük ki.

A 9. ábrán a VK1E10-szekvenciát a legnagyobb fokú homológiát mutató humán szekvenciával rendez-



tük össze. Az amfipatiás szegmentumokat aláhúzással, a CDR-régiókat vastag szedéssel emeltük ki.

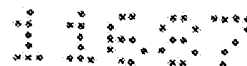
A 10. ábrán az egéredetű Mab P3 és a kiméra Mab 1E10 közti specifikus kötődést szemléltetjük. Különböző koncentrációjú Mab 1E10-ellenanyagot és Mab C5-ellenanyagot (negatív kontroll) teszteltünk ELISA-eljárással. Mikrotitráló lemezeket vontunk be Mab P3- és Mab A3- (negatív kontroll) ellenanyagokkal, majd a specifikus kötődést meghatároztuk.

SZEKVENCIALISTA

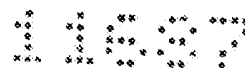
A szekvencialistában szereplő kötetlen szövegrészek (223-as kód) fordítása:

- 10 <210> 29
 <223> szintetikus
 <223> $n=(c/t)$ és $n=(a/g)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
- 15 <210> 30
 <223> szintetikus
 <210> 31
 <223> szintetikus
 <223> $n=(a/g)$ és $n=(c/g)$ és $n=(t/g)$ és $n=(c/a)$ és $n(c/g)$
- 20 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
- 25 <210> 32
 <223> szintetikus
 <210> 33
 <223> szintetikus
 <223> $n=(t/a)$ és $n=(g/t)$ és $n=(t/a)$ és $n=(g/a)$
- 30 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 34
 <223> szintetikus
- 35 <223> $n=(t/g)$ és $n=(g/a)$ és $n=(g/t)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 35
- 40 <223> szintetikus

- <210> 36
 <223> szintetikus
 <223> $n=(t/g)$ és $n=(g/a)$ és $n=(g/t)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 5 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 37
 <223> szintetikus
 <210> 38
 10 <223> szintetikus
 <223> $n=(t/a)$ és $n=(g/t)$ és $n=(t/a)$ és $n=(g/a)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 15 <210> 39
 <223> szintetikus
 <210> 40
 <223> szintetikus
 <210> 41
 20 <223> szintetikus
 <223> $n=(a/g)$ és $n=(c/g)$ és $n=(t/g)$ és $n=(c/a)$ és $n=(c/g)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 25 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 42
 <223> szintetikus
 <210> 43
 30 <223> szintetikus
 <223> $n=(g/t)$ és $n=(a/t)$ és $n=(c/t)$ és $n=(c/t)$ és $n=(t/g)$ és
 $n=(g/a)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 35 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 44
 40 <223> szintetikus



- <223> $n=(t/g)$ és $n=(g/a)$ és $n=(g/t)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 5 <210> 45
 <223> szintetikus
 <210> 46
 <223> szintetikus
 <210> 47
 10 <223> szintetikus
 <210> 48
 <223> szintetikus
 <223> $n=(a/g)$ és $n=(c/g)$ és $n=(t/g)$ és $n=(c/a)$ és $n=(c/g)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 15 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 49
 20 <223> szintetikus
 <210> 50
 <223> szintetikus
 <210> 51
 <223> szintetikus
 25 <210> 52
 <223> szintetikus
 <223> $n=(a/g)$ és $n=(c/g)$ és $n=(t/g)$ és $n=(c/a)$ és $n=(c/g)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 30 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 53
 <223> szintetikus
 35 <210> 54
 <223> szintetikus
 <210> 55
 <223> szintetikus
 <210> 56
 40 <223> szintetikus



- <223> $n=(a/g)$ és $n=(c/g)$ és $n=(t/g)$ és $n=(c/a)$ és $n=(c/g)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 5 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <210> 57
 <223> szintetikus
 <210> 58
 10 <223> szintetikus
 <223> $n=(t/g)$ és $n=(g/a)$ és $n=(g/t)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 15 <210> 59
 <223> szintetikus
 <210> 60
 <223> szintetikus
 <223> $n=(g/t)$ és $n=(a/t)$ és $n=(c/t)$ és $n=(c/t)$ és $n=(t/g)$ és
 20 $n=(g/a)$
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 25 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t
 <223> az n jelentése a, c, g, vagy t

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 30 1. Kiméra monoklonális ellenanyag, amely az ECACC gyűjteményében 94113026 nyilvántartási számon
 letétbe helyezett hibridómasejtvonal által termelt, Mab P3 jelzésű, N-glikolilezett szialcavat tartalmazó
 gangliozidokat felismerő egéreredetű monoklonális ellenanyagból származik, és amelyben az Mab P3 ellen-
 anyag nehézláncának és könnyűláncának hipervariábilis doménjei a következő szekvenciákat tartalmazzák:

nehézlánc:

- 35 CDR1: RYSVH;
 CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS;
 CDR3: SGVREGRAQAWFAY;

könnyűlánc:

- 40 CDR1: KASQDVSTAVA;
 CDR2: SASYRYT;



CDR3: QQHSTPWT., és

amelyben az Mab P3 ellenanyag a nehéz- és könnyűláncának vázrégiói (FR) az alábbi szekvenciákat tartalmaznak:

nehézlánc:

5 FR1: QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLG;
FR2: WVRQPPGKGLEWLG;
FR3: RLSISKDNSKSKVFLKMNSLQTDITAMYYCAR;
FR4: WGQGTLY

könnyűlánc:

10 FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC,
FR2: WYQQKPGQSPKLLIY;
FR3: GVPDRFTGSGSGTDFITFISSVQAEDLAVYYC;
FR4: FGGGTKL,

15 ahol a kíméra monoklonális ellenanyag – az ellenanyag humanizálása és antigénkötő tulajdonságának megtartása érdekében – a könnyűlánc FR1-régiójában a következő szubsztitúciókat tartalmazza:

a 8. pozícióban: His helyett Pro;

a 9. pozícióban: Lys helyett Ser;

a 10. pozícióban: Phe helyett Ser;

a 11. pozícióban: Met helyett Leu; és/vagy

20 a 13. pozícióban: Thr helyett Ala.

2. 4. Az 1. igénypont szerinti monoklonális ellenanyag, amelyben a nehézlánc konstans régiója humán immunoglobulinból származó gamma-1-lánc-aminosav-szekvenciát, a könnyűlánc konstans régiója humán immunoglobulinból származó kappa-lánc aminosav-szekvenciát tartalmaz.

3. Sejtvonala, amely az 1-2. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyagot termel.

25 4. Gyógyászati készítmény malignus emlőtumороk és melanómák, valamint azok áttéteinek és relapszusainak kezelésére, amely az 1-2. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyagot tartalmaz.

5. Gyógyászati készítmény malignus emlőtumороk és melanómák, valamint azok áttéteinek és relapszusainak „in vivo” lokalizálására és/vagy azonosítására, amely az 1-2. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyagot tartalmaz.

30 6. Az 1-2. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyag alkalmazása malignus emlőtumороk és melanómák, valamint azok áttéteinek és relapszusainak kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

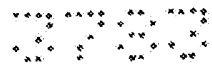
A meghatalmazott:

35

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Dr. Svíngor Ádám
szabadalmi ügyvivő

40



1. ábra

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 L K E S G P S L V K P S Q S L S I T C T V S
 VH P3 CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGA CCT GGC CTS GTS GKA CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TSC ACT GVS 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 B Q P P G K O L E W L
 VH P3 GGG TTC TCA TTA TCC AGA TAT AGT GTA CAC TGG GAT GGC 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 S T D Y N S A L K S R L S I S
 VH P3 GGA ATG ATA TGG GGT GGT GGA AGC AGA GAG TAT AAT TCA GCT CTC AAA TCC AGA CTG AGC ATC AGC

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 N M B S L Q T D D T A M Y Y C
 VH P3 AAG GAC AAC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AKA 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 P S S V R R G R A Q A W F A Y W G Q G T L V
 VH P3 GCT AGA AGT GGG GTA CGA GAG GGA AGG GCC CAG GGC TGG TTT GGT TAC TGG GGC CAA GGC ACT
 CTG CTC

2. ábra

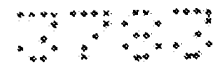
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 D I V W T Q S B K F M S T S V G D R V S I T C K A
 VKP3 GAG ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC AAG TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AAG GTC AGC ATC ACC TCC AAG GCC

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 K V A W Y Q Q K P G Q S P R L L I Y S
 VKP3 AGT CAG GAT GTC AGT ACT GCT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC TCG

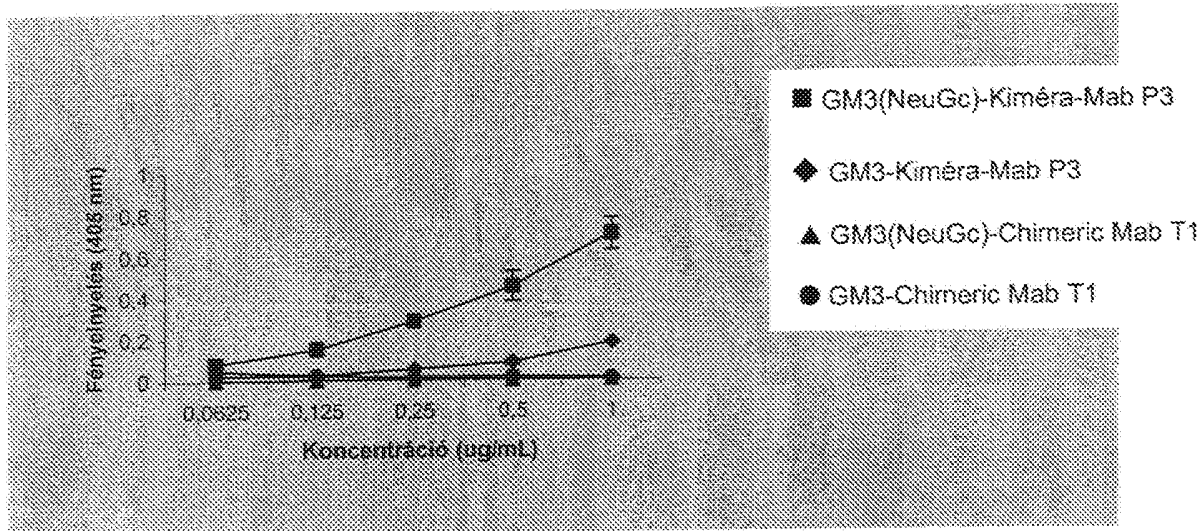
CDR2
 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 A S Y R Y Y G V P D H F T G S G S G T G F T P T I
 VKP3 GCA TCC TAC CCG TAC ACT GGA GTC CTT GAT GGC TTC ACT GGC AGT GGA TCT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC

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 C Q Q H Y S T F W T F G G
 VKP3 AGC AGT GTC CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG TTC GGT GGA

101 102 103 104
 G T K L
 VKP3 GGC ACC AAG CTG



5. ábra



6. ábra

	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
VH 1E10	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	S	L	V	K	F	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S
	CAG	GTY	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAA	CTG	GTA	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG	TTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT
	CDR1																								
VH 1E10	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36a	36b	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	G	Y	T	F	T	S	Y	D	I	N			W	V	R	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I
	GCC	TAC	ACC	TTC	ACA	AGC	TAT	GAT	ATA	AAC			TGG	GTG	AGG	CAG	AGG	CCY	GAA	CAG	GGA	CTT	GAG	TCG	ATT
	CDR2																								
VH 1E10	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	W	I	F	E			G	D	G	S	T	K	Y	W	E	K	E	K	G	K	A	T	L	T
	GGA	TGG	ATT	TTT	CCT			GGA	GAT	GCT	AGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	GCC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT
	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
VH 1E10	T	D	K	S	S	S	T	A	Y	N	Q	L	S	R	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	P	C
	ACA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGG	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCT	GTC	TAT	TYC	TGT
	CDR3																								
VH 1E10	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	b	c	d	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111		
	A	R	E	D	Y	Y	D	N	S	Y	Y	E	E	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V		
	GCA	AGA	GAA	CAC	TAC	TAT	GAT	AAC	TCC	TAC	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GCC	CAA	GCC	ACC	ACT	CTC	ACK	GTC		

7. ábra

```

      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
VK1E10  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

      CDR1
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
VK1E10  S Q          D I E N Y L N W Y G Q K P D G T Y
      AGT CAG          GAC ATT AGC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT

      CDR2
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
VK1E10  K L L I Y Y T S E L H S G V P S P F S G S G S G T
      AAA CTC CTC ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA

      CDR3
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
VK1E10  Q Y S L T X S R L E Q E D I A T Y P 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

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

```

8. ábra

```

      10      20      30      40      50      60
VK1E1G  QVQLQQSGAELVRFPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVRFQPFQGLEWIGWIFPGDSTKY
      .X: .....
buhoVH  QTQLVQSGAEVRFPGASVRFVSCKASGITFTIDSYIHWIRQAPGHGLEWVGVINPNSGGFNY

      10      20      30      40      50      60
VK1E1G  NEKFKGKATLTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARED-----YY--DNSYFDYWGQ
      .....
buhoVH  APRFQGRVTMTRDASFTSTAYMDLRSLSRSDSDSAVFYCAKSDPFWSDYINFDVSYTLDVWGQ

      70      80      90      100     110     120
VK1E1G  STSLTV
      .....
buhoVH  GTTVTV

```

9. ábra

```

      10      20      30      40      50
VK1E10 DIQMTQTTSSLSASLGDRTVITSCFASQDIENYLMWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVP
      .....X.....
huhoVK DIQMTZSPGSLASAVGERVTITCRASZTISSYLBWYZZKPKAPBLLIYAASBLHSGVP
      10      20      30      40      50

      50      70      80      90      100
VK1E10 SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGVTLPNTFGGGTKLESK
      .....X
huhoVK SRFSGSGSGTBTFTTISLZPEBFATFYCZZSYSSPTTFGZGTRLZIK
      50      70      80      90      100
    
```

10. ábra

