

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 424

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-2668**
 (22) Přihlášeno: **08.04.2002**
 (30) Právo přednosti: **06.04.2001 CU 8401**
 (40) Zveřejněno: **14.07.2004**
 (**Věstník č. 7/2004**)
 (47) Uděleno: **19.03.2014**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **30.04.2014**
 (**Věstník č. 18/2014**)
 (86) PCT číslo: **PCT/CU2002/000003**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/081496**

(56) Relevantní dokumenty:
 Vázquez AM et al. Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. *Oncology Reports*, 2000, 7(4), 751-756..
 EP 0657471; 71058; 71059.

(73) Majitel patentu:
 CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR,
 Ciudad Habana, CU

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

(74) Zástupce:
 Rott, Růžička & Guttman
 Patentové, známkové a advokátní kanceláře, Ing.
 Ivana Jirotková, Vinohradská 37, 120 00 Praha 2

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

(57) Anotace:
 Řešení popisuje chimerní monoklonální protilátku odvozenou z myši antiidiotypové monoklonální protilátky 1E10, která rozpoznává myší MAb P3 a je produkována hybridomovou buněčnou linií s depozitním číslem ECACC 97112901. Tato chimerní monoklonální protilátka zahrnuje konstantní oblasti odvozené od lidských imunoglobulinů a specificky humanizované variabilní oblasti protilátky 1E10. Dále se popisují buněčné linie, které exprimují chimerní a humanizované protilátky, a farmaceutické kompozice obsahující tyto protilátky.

CZ 304424 B6

Rekombinantní protilátky související s gangliosidy a jejich použití při diagnóze a léčbě nádorů

5 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-glykolylovanou kyselinu sialovou, ale nikoli s acetylovanými formami gangliosidů ani s neutrálními glykolipidy. Gangliosidy obsahující N-glykolylovanou 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-glykolyl (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 myši monoklonální protilátka s IgM isotypem, která se získá, když se spojí myši splenocyty z myši BALB/c imunizované lipo-

- somy 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–glykolylovanou 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).
- Antiidiypová MAb 1E10 (MAbai 1E10) subtypu IgG1 se získala z myši BALB/c imunizované s MAb P3 vázané na KLH (patent US 6 063 379, buněčná linie uložena pod přístupovým číslem ECACC 97112901). MAbai 1E10 rozpoznávala MAb P3 a nevázála 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 myší ošetřenou irelevantním IgG. Tyto výsledky naznačují, že se spouští více než jeden mechanismus protinádorového účinku (Vázquez a spol. (2000): Antitumor properties of an antiidiotypic 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 myší 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 antigenicitou 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 antigenicity byly chimerní protilátky, ve kterých se variabil-

ní 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; Verhoeven 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 (patent US 5 712 120) popsali způsob snížení imunogenity myších protilátek. Podle tohoto způsobu se modifikace omezují na variabilní domény a konkrétně na myší oblasti základní struktury (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 méně genových manipulací.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou rekombinantní protilátky získané technologií genového inženýrství. Konkrétně je předmětem vynálezu chimerní monoklonální protilátka odvozená z myší anti-idiotypové monoklonální protilátky 1E10, kde tato myší protilátka 1E10 rozpoznává myší MAb P3 a je produkována hybridomovou buněčnou linií s depozitním číslem ECACC 97112901, a kde tato chimerní monoklonální protilátka zahrnuje

- a. konstantní oblast těžkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin gama–1 řetězce a konstantní oblast lehkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin kapá řetězce, obě odvozené z lidských imunoglobulinů,
- b. hypervariabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců obsahující následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG

CDR3: EDYYDNSYYFDY

LEHKÝ ŘETĚZEC

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

- c. úseky základní struktury (FR) těžkých a lehkých řetězců obsahující následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

FR4: WGQGTTLTV

LEHKÝ ŘETĚZEC

FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

FR4: FGGGTKLESK, a

5

- d. pro další humanizaci a zachování vazebných vlastností k antigenu zahrnuje variabilní oblast protilátky přinejmenším jednu z následujících substitucí:

LEHKÝ ŘETĚZEC

pozice 7 ve FR1: Thr za Ser

pozice 8 ve FR1: Thr za Pro

pozice 15 ve FR1: Leu za Val

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

pozice 5 ve FR1: Gln za Val

pozice 5 ve FR2: Arg za Ala

pozice 7 ve FR2: Glu za Gly

pozice 21 ve FR3: Thr za Arg

10

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.

15

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.

- 5 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*.

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

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

- 20 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), 2,5mM každého dNTP, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 75mM KCl, 10mM DTT, 8mM MgCl₂ a 15 jednotek inhibitoru RNA polymerasy v 50 µL 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.

- 25 Variabilní oblasti VK a VH cDNA se amplifikovaly pomocí PCR. Krátce, 5 µL cDNA VH nebo VK se smíchalo s 25 pmoly specifických primerů, 2,5mM každé dNTP, 5 µL 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.

- 30 Klonování a sekvenování amplifikované cDNA.

- 35 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.

- 40 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).

- 45 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 resistentní 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 geny resistance k mykofenolové kyselině a lidskou kapa konstantní oblast. Výsledné konstrukce byly P3VK–PAG4622 a 1E10VK–PAG4622.

50

Expresce 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 v ledu byly buň-
ky vystaveny impulzu 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 10mM histidinolem). Transfektované klony byly po 14 dnech viditelné pouhým okem.

Přítomnost lidské protilátky v médiu jamek obsahujících transfektované klony se měřila pomocí
ELISA. Jamky mikrotitrační destičky se smočily kožími protilátkami proti lidskému kapa lehké-
mu 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 při-
dalo do každé mikrotitrační jamky zředěné kultivační médium z jamek obsahujících transfektan-
ty. Jamky se promyly s PBS-T a přidala se koží protilátka proti lidskému kapa lehkému řetězci
konjugovaná s křenovou peroxidasou nebo koží anti-lidský IgG (specifický pro gama řetězec)
konjugovaný s alkalickou fosfatase a jednu hodinu se inkubovaly při 37 °C. Jamky se promyly
PBS-T a přidala se substrátový pufr obsahující *o*-fenyldiamin 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 porovnaly 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 soft-
ware PC-TWO HIBIO PROSIS 06-00.

Analýza snížení imunogenity.

Cílem způsobu je snížení imunogenity zmírněním nebo humanizováním potenciálních imunogen-
ních T epitopů s minimálními změnami. Způsob zahrnuje uvážlivé nahrazení několika málo
zbytků aminokyselin umístěných v spirálovitých amfipatických segmentech. Aminokyseliny, kte-
ré 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 porovnávaly 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 mutagenese.

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. Výsledné 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 potáhla 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 koží antilidská protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou 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 MAb 1E10 byla zkouška ELISA podobná, s výjimkou, že se jamky potáhly 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 čárami.

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.

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

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

10

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 potáhly 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).

15

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 čarami.

20

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 čarami.

- 25 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.

30

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 potáhly 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).

35

Příklady provedení vynálezu

- 40 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.

45

syntéza cDNA se provedla reakcí s enzymem reversní transkriptasou, 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 Sheria 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 transfekovaly s 10 µg P3VK–PAG4622, klon exprimující lehký řetězec se transfekoval s 10 µg P3VH–PAH4604, v obou případech se DNA před transfekcí linearizovala PvuI, precipitovala ethanolom a rozpustila v 50 µL PBS.

Přibližně 10^7 buněk se sklidilo 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 pulzu 200 V a 960 µF a ponechaly se v ledu dalších deset minut. Buňky se rozdělily do 96 jamek destičky s D'MEM F12 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 10mM histidinolem). Transfektované klony byly viditelné po čtrnácti dnech pouhým okem.

Přítomnost lidské protilátky v médiu jamek obsahujících transfektované klony se měřila pomocí ELISA. Jamky mikrotitrační destičky se potáhly kozími protilátkami proti lidskému kapu 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 kapu lehkému řetězci konjugovaná s křenuvou peroxidasou nebo kozí anti-lidský IgG (specifický pro gama řetězec) konjugovaný s alkalickou fosfatase a jednu hodinu se inkubovaly při laboratorní teplotě. Jamky se promyly PBS-T a přidala se substrátový pufr obsahující *o*-fenylendiamin nebo *p*-nitrofenylfosfát. 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 porovnaly s lidskými sekvencemi. Na obr. 3 a 4 jsou ukázány lidské sekvence s nejvyšší homologií. Spirálovité amfipatické oblasti nebo potenciální T buněčné epitopy se vyhledávaly v sekvencích myší 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-PAH4622. Pro expresi humanizované protilátky P3 se buňky NS-0 transfektovaly s P3VH-PAH4604 a P3VKhu-PAH4622.

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

Příklad 3: Biologická aktivita chimerní MAb P3.

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

10 Pro rekombinantní MAb P3 se mikrotitrační destička potáhla 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 fosfatase 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.

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

Příklad 4: Získání chimerní MAb 1E10.

20 Syntéza cDNA se provedla reakcí s enzymem reversní transkriptasou, 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:

25 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):

30 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 savcích 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 PvuI, precipitovala ethanolom 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 pulzu 200 V a 960 µF a ponechaly se v ledu dalších deset minut. Buňky se rozdělily do 96 jamek destičky s D'MEM F12 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 10mM histidinolem). Transfektované klony byly viditelné po čtrnácti dnech pouhým okem.

Přítomnost lidské protilátky v médiu jamek obsahujících transfektované klony se měřila pomocí ELISA. Jamky mikrotitrační destičky se potáhly 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 s křenovou peroxidasou nebo kozí anti–lidský IgG (specifický pro gama řetězec) konjugovaný s alkalickou fosfátasou a jednu hodinu se inkubovaly při laboratorní teplotě. Jamky se promyly PBS–T a přidala se substrátový pufr obsahující *o*–fenylendiamin nebo *p*–nitrofenylfosfát. Po půl hodině se měřila absorbance při 492 nebo 405 nm.

Příklad 5: Získání rozličných verzí humanizované protilátky 1E10.

Sekvence myši VH1E10 a VK1E10 (obr. 6 a 7) se porovnály 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 nevyšší 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.

- 5 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'

- 10 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:

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'

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

- 20 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 protilátku.

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 potáhla 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 ukazují obr. 10.

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Chimerní monoklonální protilátka odvozená z myši anti-idiotypové monoklonální protilátky 1E10, kde tato myši protilátka 1E10 rozpoznává myši MAb P3 a je produkována hybridomovou buněčnou linií s depozitním číslem ECACC 97112901, a kde tato chimerní monoklonální protilátka zahrnuje

10 a) konstantní oblast těžkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin gama-1 řetězce a konstantní oblast lehkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin kapá řetězce, obě odvozené z lidských imunoglobulinů,

b) hypervariabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců obsahující následující sekvence:

15

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG

CDR3: EDYYDNSYYFDY

LEHKÝ ŘETĚZEC

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

c) úseky základní struktury (FR) těžkých a lehkých řetězců obsahující následující sekvence:

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

FR4: WGQGTTLTV

LEHKÝ ŘETĚZEC

FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

20

FR4: FGGGTKLESK, a

d) pro další humanizaci a zachování vazebných vlastností k antigenu zahrnuje variabilní oblast protilátky přinejmenším jednu z následujících substitucí:

LEHKÝ ŘETĚZEC

pozice 7 ve FR1: Thr za Ser
 pozice 8 ve FR1: Thr za Pro
 pozice 15 ve FR1: Leu za Val

TĚŽKÝ ŘETĚZEC

pozice 5 ve FR1: Gln za Val
 pozice 5 ve FR2: Arg za Ala
 pozice 7 ve FR2: Glu za Gly
 pozice 21 ve FR3: Thr za Arg .

2. Buněčná linie, která produkuje chimerní monoklonální protilátku podle nároku 1.
- 5 3. Farmaceutická kompozice pro použití při léčbě maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje chimerní monoklonální protilátku podle nároku 1.
- 10 4. Farmaceutická kompozice pro použití při lokalizaci a identifikaci maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů „in vivo“, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje chimerní monoklonální protilátku podle nároku 1.
- 15 5. Použití chimerní monoklonální protilátky podle nároku 1 pro výrobu léku pro léčbu maligních nádorů prsu a melanomů, jejich metastází a relapsů.

10 výkresů

20

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 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 NAT 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 AAG AGC 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 R G 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 GGC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGC ACT CTG

GTC

Obr. 1

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	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
	VKP3																								
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	K	P	G	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	TGG
	VKP3																								
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	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
	VKP3																								
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	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	GGT	GGA
	VKP3																								
101	102	103	104																						
	G	T	K	L																					
	GGC	ACC	AAG	CTG																					
	VKP3																								

Obr. 2

	10	20	30	40	50
VHP3	QVQLKESGPG	LVAPSQSL	SITCTVSG	FSLSRYSV	<u>VEWVRQPPGKGLEWLGMI-WGGGSTDY</u>
	X:::	:::	:::	:::	:::
	huhovh	QVELVESGG	VVPGRSL	RLSCAASG	FFFSNYAMH
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
VHP3	NSALKSR	LSISKDN	SKSQVFL	KMNSIQ	TDDTAMY
	huhovh	ABSVKGR	FTISRDB	SKBTLYL	QMNSLRAE
	70	80	90	100	110

Obr. 3

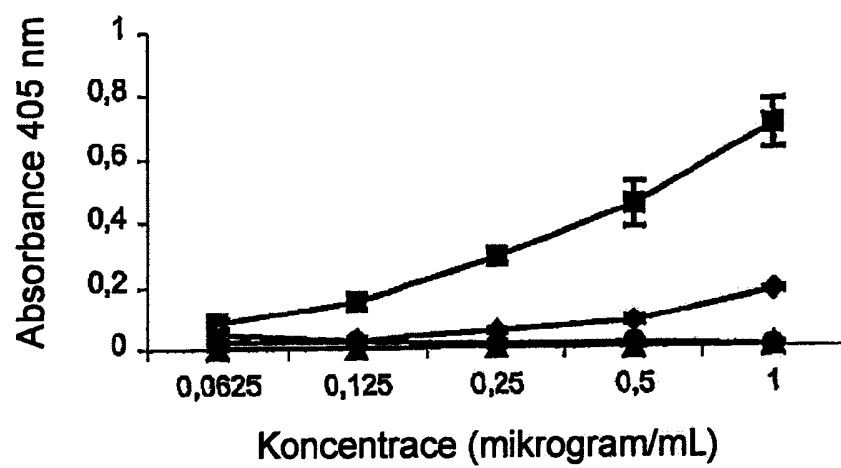
```

VKP3      10      20      30      40      50      60
          DIVMTQSHKEMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVANYQOKPGQSPQLLIYSASVRYTGVVPD
          :: :::: . . :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
huhovk    DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQDI-TNYNWFQORPGQAPKVLIIYGASILETGVTIS
          10      20      30      40      50

```

```
VKP3      RETGSGGTDFTFIISVQAELAVYCOHYSTPWTFGGGTKL
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : X.
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
huhovk    RFSGSGGTDFTFIISLQPEDIATYCOQYDTLPITFGGGTKV
          60       70       80       90      100
```

Obr. 4



Obr. 5

VH 1E10
 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 Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S
 CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA GCT GAA CTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT

VH 1E10
 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 Y T F T S Y D I N TGG GTG AGG CAG AGG CCT GAA CAG GGA CTT GAG TGG ATT
 GGC TAC ACC TTC ACA AGC TAT GAT ATA AAC

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 P G D G S T K Y N E K F K G K A T L T
 GGA TGG ATT TTT CCT GGA GAT GGT AGT ACT AAG TAC AAT GAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT

VH 1E10
 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
 T D K S S S T A Y M Q L S R L T S E D S A V Y F C
 ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGG CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT TAT TTC TGT

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 Y D N S Y Y Y F D Y W G Q G T T L T V
 GCA AGA GAA GAC TAC TAT GAT AAC TCC TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC

Obr. 6

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

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
 S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P D G T V
 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 S G T
 AAA CTC CTG ATC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA

CDR2
 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

CDR3
 95 95a 95b 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
 P W T F G G T K L E S K
 CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA

Vk1E10

Obr. 7

```
VH1E10 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDLNWRQRPQGLEWIGWIFPPGDSITKY  

      :X: ::::: ::::: ::::: :: . :.: : : :.: : : :.: : :.: :  

huhoVH QTQLVQSGAELVRKPGASVRVSKASGITFIDSYIHWRQAAPHGLEWVGWINPNSGGPNY  

      10      20      30      40      50      60  

      70      80      90      100     110  

VH1E10 NEKFKGKATLTTDKSSSTAYMQLSRITSEDAVFCARED-----YY--DMSYYFDYWGWQ  

      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : ^ : : : :  

huhoVH APREQGRVTMTRDASFSTAYMDLRSLRSDSAVFYCAKSPFWSDYNFYNTLDVWGQ  

      10      20      30      40      50      60  

      70      80      90      100     110     120  

VH1E10 GTTLTV  

      : : : :  

huhoVH GTTVIV
```

Obt. 8

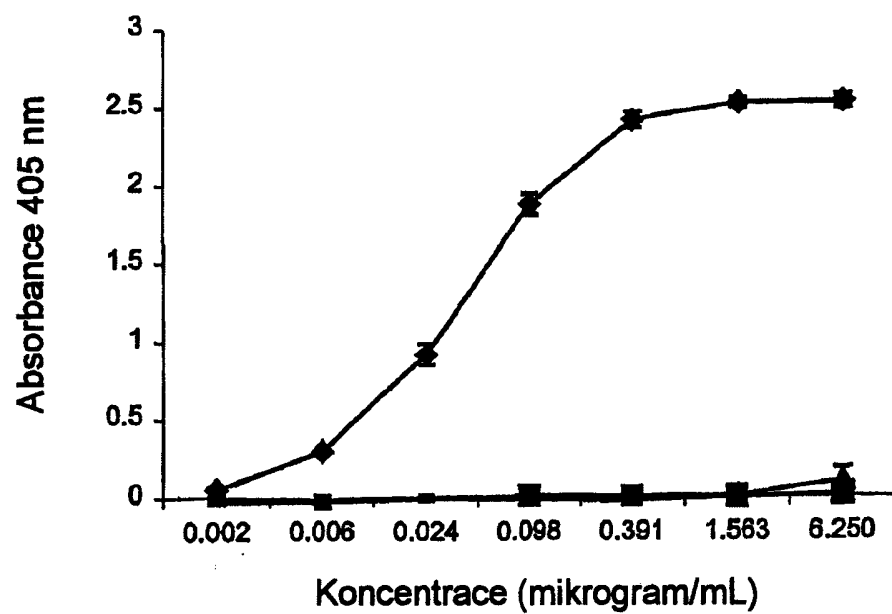
```

VK1E10 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLWYQOKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVP
      10      20      30      40      50
      :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
huhovk DIQMTZSPSSLSASVGBRVTTICRASZTSSYLBWYZZKPKGAPBLLIYAASBLHSGVP
      10      20      30      40      50

```

60	70	80	90	100
VK1E10	<u>SRFSGSGTDYSLTISNLEQED</u>	IATYFCQ	QGNZLP	WTTFGSGTKLESK
	::::::::::	::::::::::	::::::::::	::::X :
huhovk	SRFSGSGTBF	FTISSLPZ	BFATYCYCZ	SYSSPTTFGZGTRLZIK
60	70	80	90	100

Obi. 9



Obr. 10

Konec dokumentu
