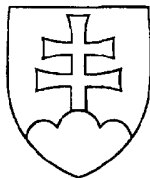


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 649

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C07K 16/28

C12N 5/20

G01N 33/577

A61K 39/395

A61K 49/00

- (21) Číslo prihlášky: **1548-96**
(22) Dátum podania prihlášky: **2. 6. 1995**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **8. 10. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **10/2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P 44 19 913.9, P 44 31 297.0**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **8. 6. 1994, 2. 9. 1994**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE, DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **6. 8. 1997**
Vestník ÚPV SR č.: **08/1997**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **23. 9. 2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP95/02126**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO95/33771**

(73) Majiteľ: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, Ingelheim am Rhein, DE; FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH, Karlsruhe, DE;**

(72) Pôvodca: **Adolf Günther R., Wien, AT; Patzelt Erik, Punksersdorf, AT;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Protilátka proti CD44v6, hybridómová bunková línia, molekula protilátky a jej použitie**

(57) Anotácia:
Je opísaná protilátka účinná proti epitopu, kódovanému variantným exónom v6 génu CD44, produkovaná hybridómovou bunkovou liniou DSM ACC2174, ktorá je vhodná na použitie v terapii, v diagnostických postupoch, ako je adsorbentová imunoanalýza alebo rádioimunoanalýza a na diagnostiku nádorov.

Oblasť techniky

Vynález sa týka monoklonálnej protilátky proti epitopu, ktorý je kódovaný variantným exónom v6 génu CD44, od nej odvodených protilátkových molekúl a použitia uvedenej protilátky v diagnostike a terapii.

Doterajší stav techniky

Nedávno sa ukázalo, že expresia variantov povrchových glykoproteínov CD44 je potrebná a postačujúca na uvoľnenie takzvaného spontánneho metastázového správania sa tak nemetastázovaných pankreasových-adenokarcinómových bunkových línií krýs, ako aj nemetastázovaných fibrosarkómových bunkových línií krýs (Günthert et al., 1991). Zatiaľ čo najmenšie CD44-izoformy a štandardné formy CD44s (alebo CD44std) sa rovnomerne exprimujú v celom rade rôznych tkanív vrátane epitelových buniek, určité štepne varianty CD44 (CD44v, CD44var) sa exprimujú iba v jednej podskupine epitelových buniek. Uvedené CD44 varianty sa môžu pripravovať alternatívnym štiepením tak, že sa z CD44s celkom vystrihnú sekvencie 10 exónov (v1 až v10), ktoré môžu byť vo väčších variantoch prítomné v rozličných kombináciách (Screaton et al., 1992; Tölget al., 1993; Hofmann et al., 1991). Varianty sa rozlišujú tým, že na jednom určitom mieste vonkajšej bunkovej časti proteínu sú vložené rozdielne aminokyselinové sekvencie. Takéto varianty možno nachádzať v rôznych bunkách ľudských nádorov a v ľudských nádorových tkanivách. Takto sa zistila expresia CD44-variantov v priebehu kolorektálnej karcinogenézy (Heider et al., 1993a). Expresia CD44-variantov chýba v normálnom ľudskom trávcovom epiteli a iba slabá expresia je zistiteľná v proliferujúcich kryptových bunkách. V neskorších štádiách šírenia nádorov, napríklad adenokarcinómov, všetky exprimujú maligne zvrhnuté varianty CD44. Silnú tkanivovú expresiu variantov CD44 možno tiež zistiť v agresívnom ne-Hodgkinovom lymfóme (Koopman et al., 1993).

Exón v6 má osobitnú úlohu najmä pri metastázovom šírení (Rudy et al., 1993). Na zvieracom modeli môže protilátka proti v6-spezifickému epitopu brzdiť kolónie metastázujúcich buniek a rast metastáz. (Seiter et al., 1993). Pri kolónových nádoroch koreluje expresia v-6 s rozvíjaním nádoru. Pri žalúdočných nádoroch je expresia v-6 dôležitým diagnostickým znakom pri diferencovaní medzi nádormi intestinálneho typu a nádormi difúzneho typu (Heider et al., 1993b). V naposledy uvedených dvoch prácach sa expresia v-6 stanovovala pomocou protilátok proti v6-spezifickému epitopu.

Monoklonálna protilátka proti epitopu, ktorý je kódovaný exónom v-6 je v súčasnom stave techniky známa (Hofmann et al., 1991; Wielenga et al., 1993). Z hľadiska vysokých potenciálnych výťažkov, ktoré tieto protilátky v diagnostike a terapii môžu mať, vzniká vysoká potreba protilátok, ktoré by mali zlepšené vlastnosti.

Podstata vynálezu

Úlohou tohto vynálezu je príprava protilátky, ktorá by mala zlepšené vlastnosti v porovnaní so známymi v6-spezifickými protilátkami.

Uvedená úloha sa týmto vynálezom vyriešila. Podstatu vynálezu tvorí protilátka s označením VFF-18. Podstatu vynálezu tvorí aj hybridómová bunková línia, ktorá uvedení protilátku vylučuje a ktorá je uložená v zbierke pod čís-

lom DSM ACC2174 u DSM - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mescheröder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Spolková republika Nemecko.

V ďalšom texte sa výrazom protilátka alebo molekula protilátky nerozumie iba úplný imunoglobulín, ale z pohľadu väzbovej špecifickosti a afinity aj ekvivalentné látky, ako sú opisované deriváty protilátky a rekombinantné molekuly protilátky.

Protilátka VFF-18 podľa tohto vynálezu sa pripraví spôsobom, aký sa uvádza v príklade 1. Protilátka sa môže ďalej získať z uloženej hybridómovej bunkovej línie. Odborníkom v danej oblasti je zrejmá možná príprava derivátov protilátky podľa tohto vynálezu, alebo - vychádzajúc z výsledkov analýzy sekvencií uvedených protilátok, a/alebo použitím hybridómovej bunkovej línie, ktorá tieto protilátky produkuje - ako získať rekombinantné molekuly protilátky s rovnakým idiotypom, to znamená molekuly protilátky, v ktorých sa nachádzajú v oblastiach určujúcich antigénové väzbové miesto („complementarity-determining regions“, CDR) rovnaké sekvencie aminokyselín ako v protilátke VFF-18. Uvedené deriváty a rekombinantné protilátkové molekuly sú preto výslovne zahrnuté do tohto patentu.

Z úplného imunoglobulínu protilátky VFF-18 sa napríklad môžu pripraviť fragmenty Fab- alebo F(ab')₂, alebo ďalšie fragmenty (Kreitman et al., 1993). Na využitie v diagnostických postupoch sa VFF-18 protilátkové molekuly, ich fragmenty alebo rekombinantné molekuly protilátky s rovnakým idiotypom môžu viazať napríklad s rádioaktívnym izotopom ¹³¹I, ¹¹¹In, ^{99m}Tc alebo s rádioaktívnymi zlúčeninami (Larson et al., 1991; Thomas et al., 1989; Srivastava, 1988), enzýmami, ako je peroxidáza alebo alkalická fosfatáza (Catty et Raykundalia, 1989), s fluorescenčnými farbivami (Johnson, 1989) alebo molekulami biotínu (Guesdon et al., 1979). Na terapeutické použitie sa VFF-18 alebo odvodené molekuly protilátky VFF-18 môžu viazať s toxínmi (Vitetta et al., 1991; Vitetta et Thorpe, 1991; Kreitman et al., 1993; Theuer et al., 1993), cytostatikami (Schrappe et al., 1992), pro-liečivami (Wang et al., 1992; Senter et al., 1989) alebo s rádioaktívnymi látkami. Protilátka sa ďalej môže viazať s cytokínom alebo iným imunomodulujúcim polypeptidom, napríklad s nádorovým nekróznym faktorom alebo interleukínom -2.

Odborník v danej oblasti je po analýze sekvencie aminokyselín protilátky VFF-18 a/alebo použitím hybridómovej bunkovej línie, ktorá uvedenú protilátku produkuje, osobitne ktorá obsahuje genetickú informáciu, schopný pripraviť rekombinantné protilátkové molekuly rovnakého idiotypu, ako je VFF-18. Uvedené rekombinantné molekuly môžu napríklad byť humanizované protilátky (Shin et al., 1989; Güssow a Seeman, 1991), bišpecifické protilátky (Weiner et al., 1993; Goodwin, 1989), jednoreťazcové protilátky („single-chain-antibody“, scFv, Johnson a Bird, 1991), úplný alebo fragmentovaný imunoglobulín (Coloma et al., 1992; Nesbit et al., 1992; Barbas et al., 1992), alebo spôsobom „miešania“ reťazcov („chain-shuffling“) pripravené protilátky (Winter et al., 1994). Humanizovaná protilátka sa môže pripraviť napríklad CDR-štiepením (EP 0239400). Môžu sa tiež modifikovať rámcové oblasti (EP 0519596). Na humanizovanie protilátok sa v súčasnosti môžu využiť spôsoby, ako je PCR (pozri napríklad EP 0368684; EP 0438310; WO 9207075) alebo počítačové modelovanie (pozri napríklad WO 9222653). Môžu sa pripraviť tiež fúzané proteíny, napríklad jednoreťazcová („single-chain“) protilátka/toxínom fúzaný proteín (Cha-

udhary *et al.*, 1990; Friedman *et al.*, 1993). Uvedené molekuly protilátky sú preto tiež zahrnuté do vynálezu.

Odborníkom skúseným v danej oblasti je tiež zrejme, ako získať presný epitop od VFF-18 a ako pripraviť ekvivalentnú protilátku s rovnakou väzbovou špecifickosťou. Môže sa to vykonať napríklad štúdiom väzby peptidu, a ako sa objasňuje v príklade 2, iba zmenou peptidu Hul. Taká protilátka sa tiež zahŕňa do tohto vynálezu.

Ďalší aspekt tohto vynálezu je použitie VFF-18 alebo od VFF-18 odvodených alebo ekvivalentných molekúl protilátky v diagnostike a v terapii.

Diagnostické postupy môžu byť známe diagnostické spôsoby s využitím molekúl protilátky podľa tohto vynálezu, napríklad enzýmová imunoabsorbentová analýza (ELISA, Catty a Raykundalia, 1989), rádioimunoanalýza (Catty a Murphy, 1989), imunohistochemické postupy (Heider *et al.*, 1993b), alebo imunopijakovanie („Western blotting“). Uvedené postupy sa môžu účelne vykonávať s tkanivami odobratými z tela alebo s telovým tekutinami, napríklad z biopsie. Vyšetrenie sa môže vykonávať na úrovni kvalitatívnej, polokvantitatívnej alebo kvantitatívnej. Uvedená protilátka alebo molekula protilátky sa pritom môže použiť napríklad spôsobom, aký sa v časti Doterajší stav techniky opísal pre inú v6-špecifickú protilátku (WO 9500851), pričom prednostné vlastnosti protilátky podľa tohto vynálezu alebo molekuly protilátky podľa tohto vynálezu znamenajú významné zlepšenie uvedených postupov.

Popri *in vitro* diagnostike sú molekuly protilátky podľa tohto vynálezu tiež vhodné na *in vivo* diagnostiku, najmä nádorov. Ak molekula protilátky je nosičom detegovateľného značkovača, potom detekcia značkovača umožňuje diagnostiku napríklad zobrazovaním nádorov *in vivo* („Imaging“), alebo napríklad umožňuje rádiopodporovanú chirurgiu („radioguided surgery“). Na použitie protilátok v spojení s rádioaktívnymi izotopmi na imunoscintilografii („Imaging“) jestvuje napríklad celý rad postupov, na základe ktorých môže odborník v danej oblasti vykonať usutočnenie tohto vynálezu (Siccardi *et al.*, 1989; Keenan *et al.*, 1987; Perkins a Pimm, 1992; Colcher *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1984).

Terapeutické použitie môže byť napríklad obdobné použitiu protilátky 1.1ASML (Seiter *et al.*, 1993). Použitie môže pritom byť buď systémové alebo topikálne, napríklad intravenózne (ako bolus alebo dlhodobá infúzia), intraperitoneálne, intramuskulárne, subkutánne alebo inými injekciami/infúziami. Možno pôsobiť tiež na jednotlivé orgány alebo údy. Protokoly podávania protilátok (v spojení s izotopmi alebo neviazaných s inými látkami), ako je úplný imunoglobulín, fragment, rekombinantná chiména molekula alebo iné, sú pri súčasnom stave techniky tohto odboru známe (Mulshine *et al.*, 1991; Larson *et al.*, 1991; Vitetta a Thorpe, 1991; Vitetta *et al.*, 1991; Breitz *et al.*, 1992; Press *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 1989; Chatal *et al.*, 1989; Sears *et al.*, 1982).

Výhodnejšie vlastnosti protilátky VFF-18 v porovnaní s inými proti-CD44v6 protilátkami sa opisujú v príkladoch 2 až 4.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: Schematické znázornenie GST-CD44(v3 až v10)-fúziových proteínov. GST = glutatión-S-transferáza z *Schistosoma japonicum*, v3 až v10 = variantná inzercia kcratinocytov-CD44. Šípka vyznačuje trombínové štiepne miesto.

Obrázok 2: Porovnanie sekvencie exónu v6 génu CD44 u človeka a krysy. Sekvencie peptidov Ral a Hul, na ktoré sa viažu protilátky 1.1ASML (proti-krysi CD44v6) a VFF-18 (proti-humánny CD44v6) sú zvýraznené tučnými písmenami. Rovnaké aminokyseliny sú označené hviezdíčkou.

Obrázok 3: Väzba CD44v6-špecifických protilátok na syntetický peptid. Väzba protilátky na uvedený peptid sa stanovila enzýmovou imunoabsorbentovou analýzou ELISA, pri ktorej sa peptid imobilizoval a potom sa inkuboval roztokom protilátky. Po príslušnom premývaní sa viazaná protilátka dokazovala pomocou protimýšacej-IgG-protilátky, konjugovanej s peroxidázou. (A): v prvom pokuse sa dokazovala väzba pre krysy-CD44v6 špecifickej protilátky 1.1ASML na peptid Ral (KWFEW EWQGK NPPT). (B): V ďalšom pokuse sa k Ral homológom peptidu z ľudskej CD44v6-sekvencie syntetizovali rôzne proti-humánne-CD44v6-hybridómy, ktoré sa viazali na peptid Hul (QWFGN RWHEG YRQT). Pritom sa ukázalo, že VFF-18 sa zreteľne lepšie viaže na peptid ako zvyčajne používaná protilátka. (C): Na kvantitatívne vyhodnotenie sa uvedené pokusy opakovali s rôznymi koncentraciami čistených protilátok. Aj pri týchto pokusoch sa ukázalo, že VFF-18 má vyššiu väzbovú afinitu ako iné protilátky.

Obrázok 4: Väzba rádioaktívne značkovanej protilátky na nádorové bunky. Tri protilátky VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) a VFF-18 (anti-v6) sa rádioaktívne označili pomocou N-sukcinimyl[2,3-³H]propionátom a použili sa na skúšky vzniku väzby na rôznych líniiach nádorových buniek. Použili sa nasledujúce bunkové línie: CHO-CD44var: rekombinantná bunková línia škrečka (z vaječníka čínskeho škrečka); ľudské varianty CD44 (exóny v3 až v10), exprimované na povrchu; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205: línie ľudského kolónového karcinómu; A431: línia ľudského karcinómu dlaždicového epitelu. Obrázok poukazuje na špecifickosť väzby protilátky na rôzne bunkové línie. Zatiaľ čo väzba v6-špecifickej protilátky VFF-7 a VFF-8 na rekombinantnú bunkovú líniu CHO-CD44var leží v rámci rovnakého poriadku, na línii nádoru protilátka má veľmi rozdielne väzbové vlastnosti. V ojedinelých prípadoch sa pozorovala iba väzba VFF-18 a v obmedzenom rozsahu väzba VFF-8 (HT-29, CaCo, COLO 205), ri ostatných líniiach buniek viazanie VFF-18 bolo zreteľne lepšie ako VFF-7.

Obrázok 5: Dôkaz rozpustných variantov CD44, ktoré obsahujú exón v6 v ľudskom normálnom sére. V sendvičovej enzýmovej imunoabsorbentovej analýze ELISA sa na prevrstvenie použili tri v6-špecifické protilátky VFF-4, VFF-7 a VFF-18. Vo všetkých troch prípadoch sa použila s peroxidázou konjugovaná CD44std-špecifická protilátka (BU-52, std = štandard) ako dokazovaná protilátka. Získoval sa signál z dvoch ľudských normálnych sér pri rôznom zriedení (skúšky (A) a (B)).

V obidvoch prípadoch možno pre VFF-18 pozorovať významne silnejší signál ako pre obidve ďalšie protilátky.

Obrázok 6: Hodnoty séra CD44 variantov, obsahujúcich v6. Dvoma rôznymi enzýmovými imunoanalýzami ELISA sa stanovil obsah rozpustného CD44var v sérach šiestich zdravých darcov. V jednej skúške sa na prevrstvenie použil VFF-7, v druhej VFF-18. Obidve protilátky rozpoznávali exón v6. Ako porovnávacie materiál v obidvoch prípadoch slúžili v CHO-bunkách získané rekombinantné rozpustné CD44 varianty (exón v3 až v10). Enzýmová imunoanalýza VFF-18 mala v priemere 3,5-násobne vyššiu hodnotu ako enzýmová imunoanalýza VFF-7. To znamená, že do séra prichádzajúce rozpustné CD44var z VFF-18 sú lepšie rozpoznávané ako z VFF-7.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Príprava monoklonálnej protilátky VFF-18
Klonovanie pGEX-fúzových proteínov

Úplná variantná oblasť HPKII typov od CD44v (Hofmann *et al.*, 1991) sa pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) amplifikovala z ľudského keratínocyt-cDNA. Použili sa obidva PCR-priméry 5'-CAGGCTGGG-AGCCAAATGAAGAAAATG-3', polohy 25 až 52, a 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', polohy 1013 až 984 LCL97-variantnej oblasti, ako ju opísal Hofmann *et al.*, obsahujúce *EcoRI*-roznávacie miesto a PCR produkt sa priamo použil na klonovanie do vektora pGEX-2T (Smith *et al.*, 1988). Výsledný konštrukt (pGEX CD44v HPKII, v3 až v10) kóduje pre fúzový proteín s asi 70 kD, pozostávajúci z glutatión-S-transferázy z *Schistosoma japonicum* a exónov v3 až v10 ľudského CD44 (obraz 1; Heider *et al.*, 1993). Fúzový proteín sa exprimoval v *E. coli* a následne sa čistil na základe afinity cez glutatión-agarózu (Smith *et al.*, 1988).

Imunizácia a výber

Samičky Balb/c myši sa imunizovali intraperitoneálne s afinitne vyčisteným fúzovým proteínom podľa nasledujúcej schémy:

1. imunizácia: 90 µg fúzového proteínu v úplnom Freundovom adjuvans
2. a 3. imunizácia: 50 µg fúzového proteínu v neúplnom Freundovom adjuvans.

Imunizácie sa vykonávali s odstupom vždy 4 týždňov. 14 dní po poslednom imunizovaní sa zvieratá ešte v troch po sebe idúcich dňoch imunizovali vždy s 10 µg fúzového proteínu v PBS. Na ďalší deň sa pomocou polyetylén-glykolu 4000 fúzovali slezinové bunky zvierat, ktoré malo vyšší protilátkový titer, s P3.X63-Ag8.653 myelómovými bunkami myši. Hybridómové bunky sa selektovali na mikrotitračných platniach v prostredí HAT (Köhler a Milstein, 1975; Kearney *et al.*, 1979).

Stanovenie protilátkového titra v séru alebo výber hybridómov sa vykonával pomocou ELISA. Pri tejto skúške sa mikrotitračné platne najprv prevrstvili s fúzovým proteínom (GST-CD44v3 až v10) alebo iba glutatión-S-transferázou. Následne sa platne inkubovali vzorkami séra v sériovom riedení alebo prežitými hybridómami a stanovovala sa špecifická protilátka pomocou s peroxidázou konjugovaných protilátok proti imunoglobulínu myši. Hybridómy, ktoré reagovali iba s glutatión-S-transferázou sa odvrhli. Ostávajúca protilátka sa najprv charakterizovala pomocou techniky ELISA s doménospecifickými fúzovými proteínmi (exón v3, exón v5 + v6, exón v6 + v7, exón v8 + v10) (Koopman *et al.*, 1993). Imunochemická účinnosť uvedených protilátok sa skúšala na ľudských kožných štepoch. Protilátka VFF-18 sa identifikovala pomocou väzby na syntetický peptid Hul (QWFGNRWHEG YRQT). Sekvenciu peptidu Hul tvorí fragment ľudského CD44-exonu v6.

Príklad 2

Väzba CD44v6-špecifických protilátok na syntetický peptid

Väzba CD44v6-špecifickej protilátky na syntetický peptid sa stanovovala pomocou enzýmovej imunoabsorbentovej analýzy ELISA.

Roztoky:

Prevrtvovací tlmivý roztok: 0,05 M roztok uhličitanu sodného, pH 9,6

Analyt. tlmivý roztok: PBS (fosfátom tlmivý soľný roztok)
0,5 %-ný BSA (albumín bovinného séra)
0,05 %-ný Tween 20

Substrátový roztok: Fa Kierkegaard & Perry Laboratories,
Gaithersburg MD, USA;

TBM peroxidázový substrát:

peroxidázový roztok B (H₂O₂) 1 : 1.

Peptid (50 µg.ml⁻¹ v prevrtvovacom tlmivom roztoku) sa cez noc imobilizoval na NUNC Maxisorp mikroplatniach (1.1ASML) alebo na Acti-A-platniach firmy Bio Products (VFF-protilátka) pri 4 °C. V prípade Acti-A-platní bol peptid na platňu viazaný kovalentne. Platne sa potom premyli s PBS/0,05 %-ný Tween, voľné adsorpčné miesta na povrchu platní sa blokovali analytickým tlmivým roztokom (1 hodinu pri teplote miestnosti) a platne sa opäť premyli s PBS/0,05 %-ným Tween 20. Platne Activ-A sa po blokovaní redukovali pomocou 10 mM bórhidridu sodného v 20 mM roztoku hydrogenuhličitanu sodného pri pH 9,0 (1 hodinu pri teplote miestnosti za pretriasania) a následne sa trikrát premyli s PBS/0,05 %-ným Tweenom 20. Potom sa do jamiek vložili hybridómy alebo roztoky protilátky v analytickom tlmivom roztoku v koncentráciách medzi 0,02 a 10 µg.ml⁻¹ a platne sa 2 hodiny inkubovali pri teplote miestnosti na prístroji na pretriasanie platní. Potom sa platne opláchli trikrát s PBS/0,05 %-ný Tween 20. Potom sa pridala protimýšacia-IgG-protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou, 100 µl na jamku, vo vhodnom zriedení v analytickom tlmivom roztoku. Po dvojhodinovej inkubácii pri teplote miestnosti na triasačke platní sa platne trikrát premyli s PBS/0,05 %-ný Tween 20 a vyfarbili sa substrátovým roztokom. Po 10 až 15 minútach sa vyvíjanie zastavilo 2 M roztokom kyseliny sírovej a pomocou fotometra sa merala absorbancia pri 450 nm (vzťažné merania pri 690 nm).

Pri prvom pokuse sa stanovila väzba krysiích CD44v6-špecifických protilátok 1.1ASML na peptid Ral (KWFEN EWQGK NPPT) - (Tabuľka 1, obrázok 3(A)).

Tabuľka 1

1.1 ASML µg.ml ⁻¹	Absorbancia
10,00	1,652
5,00	1,702
2,50	1,658
1,25	1,595
0,63	1,502
0,31	1,211
0,16	0,971
0,08	0,686
0,04	0,458
0,02	0,270

V ďalšom pokuse sa syntetizoval k Ral homológny peptid z ľudského CD44v6 sekvencie (Hul, QWFGN RWHEG YRQT). Na Hul boli viazané rôzne proti-humánne-CD44v6-protilátky. Pri tom sa zistilo, že VFF-18 má prekvapujúco vyššiu väzbovú afinitu v porovnaní s ďalšími použitými protilátkami (Tabuľka 2, obrázok 3 (B)).

Tabuľka 2

Protilátka	Absorbancia
VFF-2	0,067
VFF-4	1,333
VFF-7	0,199
VFF-18	2,384

Na kvantitatívne vyhodnotenie sa na peptid Hul viazali osobitne vyčistené proti-humánne-CD44v6-protilátky v rôznych koncentráciách. Aj tu sa zreteľne ukázala lepšia

väzbová afinita v porovnaní s ďalšími protilátkami (Tabuľka 3, obrázok 3 (C)).

Tabuľka 3

$\mu\text{g.ml}^{-1}$	VFF-4	VFF-7	VFF-18
10,000	1,225	0,247	2,320
3,333	1,404	0,226	2,550
1,111	0,853	0,094	2,483
0,370	0,336	0,054	2,426
0,123	0,163	0,028	1,354
0,041	0,086	0,025	0,615
0,014	0,048	0,021	0,266
0,005	0,036	0,031	0,095
0,002	0,021	0,021	0,061

Príklad 3

Väzba rádioaktívne značenej CD44v6-špecifickej protilátky na nádorovú bunkovú líniu

Rádioaktívne značenie protilátky

1 mCi N-sukcínimidyl-[2,3- ^3H]propionátu (^3H -NSP, Amersham 1 mCi. ml^{-1}) sa v posilikonovanej rúrke za vákua vodnej vývevy a pri 0 °C čo najrýchlejšie vyparil až do sucha. Pridalo sa 15 μg protilátky (1 mg. ml^{-1} v PBS, pH 7,4) a ponechalo sa 48 hodín pri 4 °C. Následne sa nadbytočný ^3H -NSP odstránil reakciou s 30 μl 1 M roztoku glycinu v PBS (20 minút pri teplote miestnosti). Oddelenie značkovanvej protilátky od ^3H -glycinu sa vykonalo na stĺpci Sephadexu G 25 (objem stĺpca 15 ml), pričom sa ako premývací tlmivý roztok použil PSB/0,5 %-ný BSA. ^3H -značovaná protilátka bola vo vytekajúcich objemoch kvapaliny. Množstvo protilátky sa stanovilo pomocou enzýmovej adsorbentovej imunanalýzy ELISA detekciou myšacím imunoglobulínom a potom sa vypočítala špecifická aktivita.

Väzba rádioznačenej protilátky na nádorové bunky

Tri protilátky, VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) a VFF-18 (anti-v6) sa označili rádioaktívnym N-sukcínimidyl-[2,3- ^3H]propionátom a použili sa pri skúškach väzby na rôzne línie nádorových buniek. Pritom sa použili nasledovné bunkové línie: CHO-CD44var: rekombinantné bunkové línie škrekča (z vajec čínskeho škrekča); ľudské varianty CD44 (exóny v3 až v10), exprimované na povrchu; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205: línie ľudského kolónového karcinómu; A431: línia ľudského epitelového karcinómu dlaždicového epitelu.

Bunky sa vložili do otvorov 12-otvorovej kultivačnej tkanivovej platne, inkubovali sa cez noc pri 37 °C v CO_2 -liahni. Následne sa raz premýli s PBS a fixovali etanolom (1 minúta pri teplote miestnosti). Potom sa raz premýli kultivačným prostredím (RPMI 1640/10 % telacieho séra) a nastala väzba rádioaktívnej protilátky (250 000 dpm/jamku v kultivačnom prostredí). Po 25 hodinovej inkubácii pri teplote miestnosti na zariadení na pretriasanie platní sa platne trikrát premýli s PBS/0,5 %-ným BSA, bunky sa solubilizovali pomocou 0,1 M roztoku NaOH/1 %-ný triton X-100 a merala sa rádioaktivita scintilačným počítačom. Nešpecifická väzba sa stanovila za prítomnosti 100-násobného nadbytku neoznačenej protilátky. Väzba sa vyjadrila vo vzťahu na jednotkový počet buniek (na 400 000 buniek). Po stanovení špecifickej aktivity protilátky bolo možné vyjadriť množstvo viazanej protilátky v fmoloch.

V tabuľke 4 a na obrázku 4 je uvedená špecifická väzba protilátky na rôzne bunkové línie. Zatiaľ čo väzba v6-špecifickej protilátky VFF-7 a VFF-18 na rekombinantnú bunkovú líniu CHO-CD44var je približne rovnaká, väzbové vlastnosti k líniam nádorových buniek sú veľmi rozdielne.

V niektorých prípadoch sa pozorovala väzba iba VFF-18 a veľmi malý rozsah väzby VFF-8 (HT-29, CaCo, COLO 205), pri iných bunkových líniah viazal VFF-18 významne lepšie ako VFF-7.

Tabuľka 4

Bunková línia	VFF-7 fmol	VFF-8 fmol	VFF-18 fmol
CHO-CD44var	33,50	68,42	46,52
HCT 116	1,44	11,08	20,22
CX - 1	0,19	2,20	9,48
HT -29	0,00	2,60	26,07
CaCo	0,03	2,81	12,57
COLO 205	0,00	0,32	2,88
A431	8,19	42,32	38,73

Príklad 4

ELISA na stanovenie rozpustných CD44v6 v sére

Roztoky:

Prevrstvomací tlmivý roztok: 0,05 M roztok uhličitanu sodného, pH 9,6

Analytický tlmivý roztok: PBS (fosfátom tlmený soľný roztok)
0,5 %-ný BSA (albumín bovinného séra)
0,05 %-ný Tween 20

Riedidlo vzoriek: Fa Bender MedSystems, Wien, Rakúsko

Substrátový roztok: Fa Kierkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg MD, USA;

TBM peroxidázový substrát:

peroxidázový roztok B (H_2O_2) 1 : 1.

Mikrotitračné platne (Nunc-imunoplatne MaxiSorp F96) sa prevrstvili s 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ jednou k CD44v6-špecifickou protilátkou (inkubácia pri 4 °C cez noc). Následne sa platne premýli PBS/0,05 %-ným Tweenom, voľne adsorpcné miesta na povrchu platne sa blokovali analytickým tlmivým roztokom (1 hodinu pri teplote miestnosti) a znova sa raz premýli PBS/0,05 %-ným Tweenom. Vzorky séra sa zriedili v pomere najmenej 1 : 5 riedidlom vzoriek a ďalej sa riedili na platni v sérii riedení 1 : 2. Následne sa pridalo 50 μl /jamku proti-CD44std (klon BU-52, The Binding Site, Birmingham) protilátky, konjugovanej s chrenovou peroxidázou, vo vhodnom zriedení (1 : 3000 až 1 : 10 000) s analytickým tlmivým roztokom. Po trojhodinovej inkubácii pri teplote miestnosti na trasiacom zariadení na platne, sa platne trikrát premýli s PBS/0,05 %-ným Tweenom 20 a vyfárbili sa substrátovým roztokom. Po 10 až 15 minútach sa vyvíjanie zastavilo 2 M roztokom kyseliny sírovej, a fotometrom sa merala absorbancia pri 450 nm (vzťažná vlnová dĺžka 690 nm).

Na kvantifikáciu sa paralelne k vzorkám séra pripravilo riedenie rozpustného CD44-štandardného preparátu v sérii riedení s analytickým tlmivým roztokom. Tento preparát sa získal vyčistením prežitých rekombinantných buniek (CHO) škrekča, ktoré exprimujú rozpustný CD44v3. Pri CD44v3 až v10 ide o ľudský CD44 variant, ktorý obsahuje cez exóny v3 až v10 kódovanú peptidovú sekvenciu.

Tabuľka 5 a obrázok 5 podávajú dôkaz rozpustných variantov CD44, ktoré obsahujú exón v6, v normálnom ľudskom sére. V sendvičovej ELISA sa použili uvedené tri v6-špecifické protilátky VFF-4, VFF-7 a VFF-18 ako prevrstvomacie protilátky. Vo všetkých troch prípadoch sa ako dôkazová protilátka použila CD44std-špecifická protilátka (BU-52, std = štandardná), konjugovaná s peroxidázou. Uvádzajú sa signály z dvoch rôznych ľudských sér pri rôznych

zriedeniach. V obidvoch prípadoch ((A) a (B)) sa pri VFF-18 pozoruje významne silnejší signál ako pri ostatných dvoch protilátkach.

Tabuľka 5 A

Sérum 1

Zriedenie	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1 : 5	0,406	0,417	3,143
1 : 10	0,378	0,289	3,055
1 : 20	0,296	0,179	2,630
1 : 40	0,207	0,072	1,778
1 : 80	0,109	0,062	1,084
1 : 160	0,050	0,030	0,594
1 : 320	0,026	0,008	0,318
1 : 640	0,012	0,007	0,159

Tabuľka 5 B

Sérum 2

Zriedenie	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1 : 5	1,690	1,280	3,290
1 : 10	1,756	1,185	3,321
1 : 20	1,564	0,857	3,163
1 : 40	1,213	0,468	3,050
1 : 80	0,699	0,208	2,537
1 : 160	0,336	0,061	1,666
1 : 320	0,138	0,014	0,988
1 : 640	0,054	0,018	0,546

Tabuľka 6 a obrázok 6 znázorňujú hodnoty séra CD44 variantov, obsahujúcich v6. Dvoma rôznymi skúškami E-LISA bol stanovený obsah rozpustnej CD44var v sérach šiestich zdravých darcov. Pri jednej skúške sa ako prevrstvovacia protilátka použila VFF-7, v druhej VFF-18. Obidve protilátky rozoznávajú exón v6. Ako porovnávací preparát slúžil v obidvoch prípadoch v CHO-bunkách pripravený rekombinantný CD44-variant (exón v3 až v10). ELISA s VFF-18 mala v priemere 3,5 násobne vyššie hodnoty ako ELISA s VFF7. Znamená to, že v sére sa nachádzajúce rozpustné CD44var sú v porovnaní k rekombinantným proteínom lepšie rozoznávané VFF-18 ako VFF-7.

Tabuľka 6

Darca	VFF-7 ng.ml ⁻¹	VFF-18 ng.ml ⁻¹	VFF-18/VFF-7
1	18,2	75,9	4,17
2	32,1	85,5	2,66
3	22,4	87,6	3,91
4	27,7	91,6	3,31
5	26,8	98,3	3,67
6	95,4	33,2	3,48
stred			3,53
št. odchýlka			0,52
CV %			14,9 %

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protilátka proti epitopu obsahujúca sekvenciu aminokyselín, ktorá je kódovaná premenným exónom v6 génu CD44, **v y z n a ť u j ú c a s a t ý m**, že je to protilátka VFF-18, produkovaná hybridómovou bunkovou líniou s úschovným číslom DSM ACC2174.

2. Hybridómová bunková línia uložená pod číslom DSM ACC2174.

3. Molekula protilátky získaná chemickou alebo enzymatickou modifikáciou protilátky podľa nároku 1.

4. Molekula protilátky podľa nároku 3, ktorá je fragmentom protilátky podľa nároku 1.

5. Molekula protilátky podľa nároku 4, ktorou je Fab alebo F(ab')₂-fragment.

6. Molekula protilátky podľa nároku 3, kde protilátka je viazaná s inou molekulou.

7. Molekula protilátky podľa nároku 6, kde iná molekula je polypeptid.

8. Molekula protilátky podľa jedného z nárokov 3 až 5, kde protilátka je viazaná s rádioaktívnym izotopom.

9. Molekula rekombinantnej protilátky s idiotypom protilátky podľa nároku 1.

10. Molekula rekombinantnej protilátky podľa nároku 9, ktorou je chiméra, humanizovaná, jednoreťazcová alebo vytvorená presunom reťazcov.

11. Molekula rekombinantnej protilátky podľa nároku 9 alebo 10, ktorá je viazaná s inou molekulou alebo s rádioaktívnym izotopom.

12. Molekula protilátky, ktorá rozoznáva rovnaký epitop ako protilátka podľa nároku 1.

13. Použitie protilátky alebo molekuly protilátky podľa jedného z nárokov 1 alebo 3 až 12 v diagnostických postupoch mimo ľudského alebo zvieracieho tela.

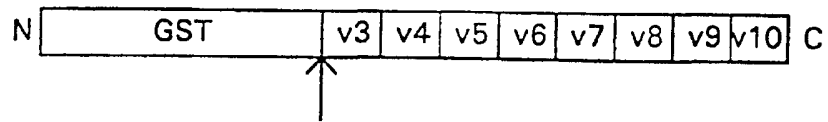
14. Použitie podľa nároku 13, kde uvedeným postupom je enzymová adsorbentová imunoanalýza alebo rádioimunoanalýza.

15. Použitie podľa nároku 13, kde uvedeným postupom je imunohistochemický postup.

16. Protilátka alebo molekula protilátky podľa jedného z nárokov 1 alebo 3 až 12, na farmaceutické použitie.

17. Použitie protilátky alebo molekuly protilátky podľa jedného z nárokov 1 alebo 3 až 11 na prípravu prostriedku na diagnostiku nádorov *in vivo*.

7 výkresov



Obr. 1

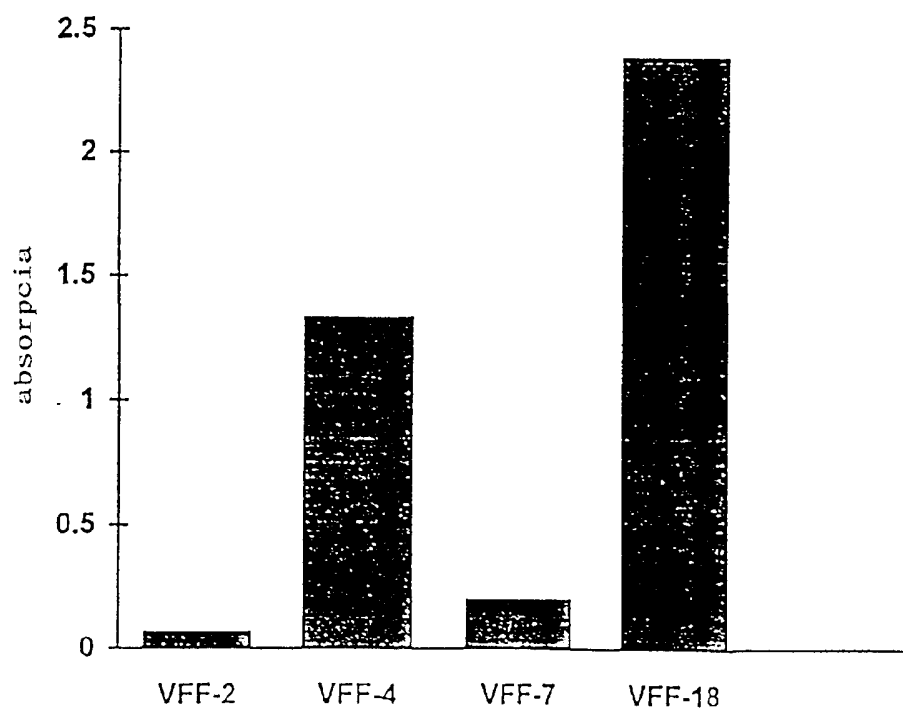
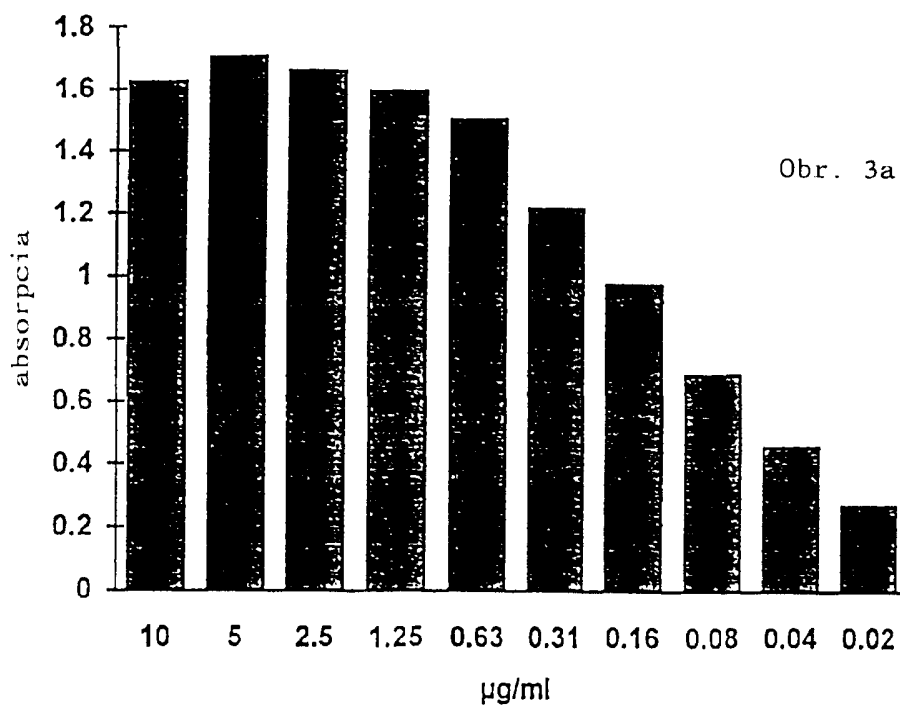
* * * * * * * * * *

človek : WADPNSTTEEAATQKEKWFENWQGKNPPTPSEDSHVTEGT T

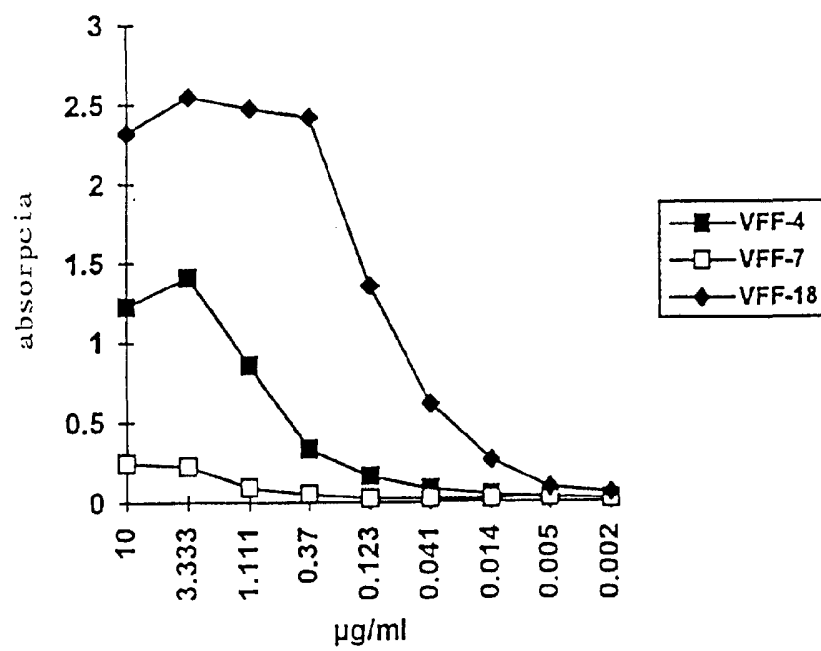
krysa: QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA

peptid Ral prípadne Hu1

3/7

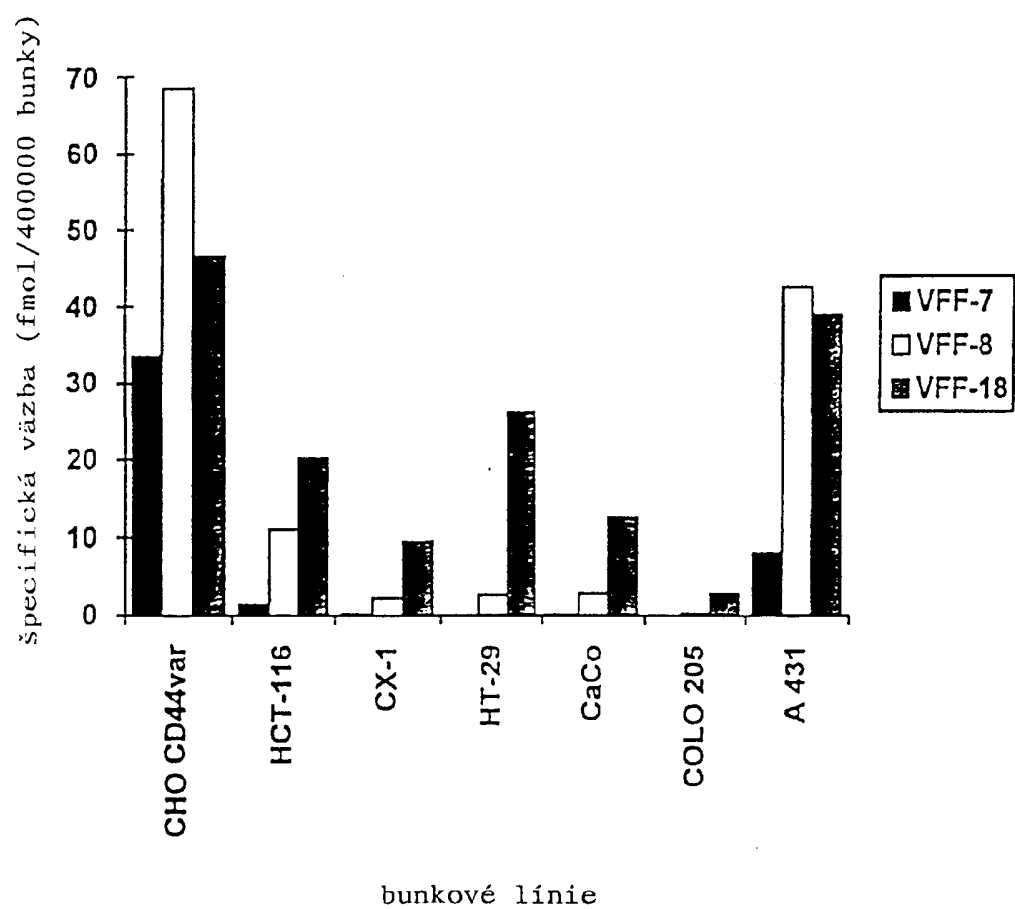


4/7



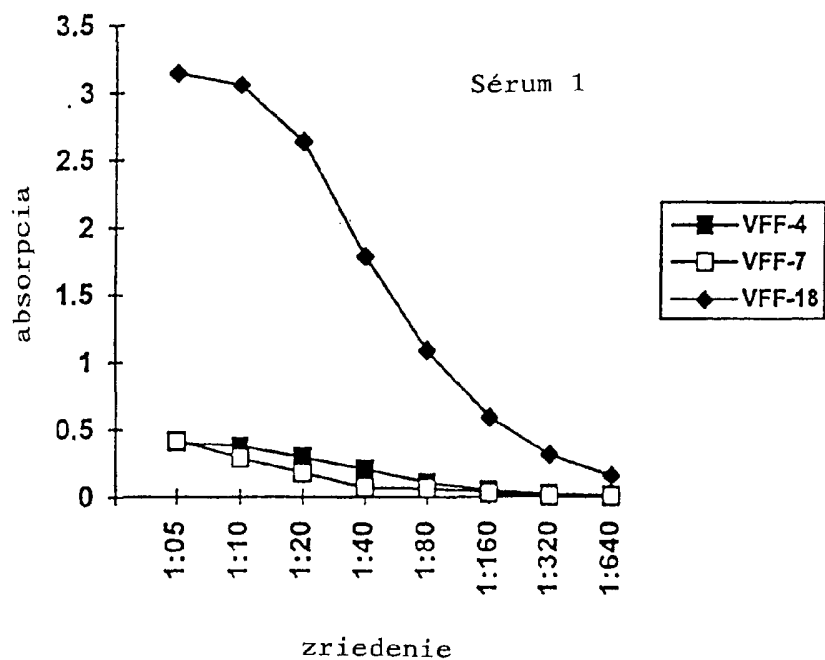
Obr. 3c

5/7

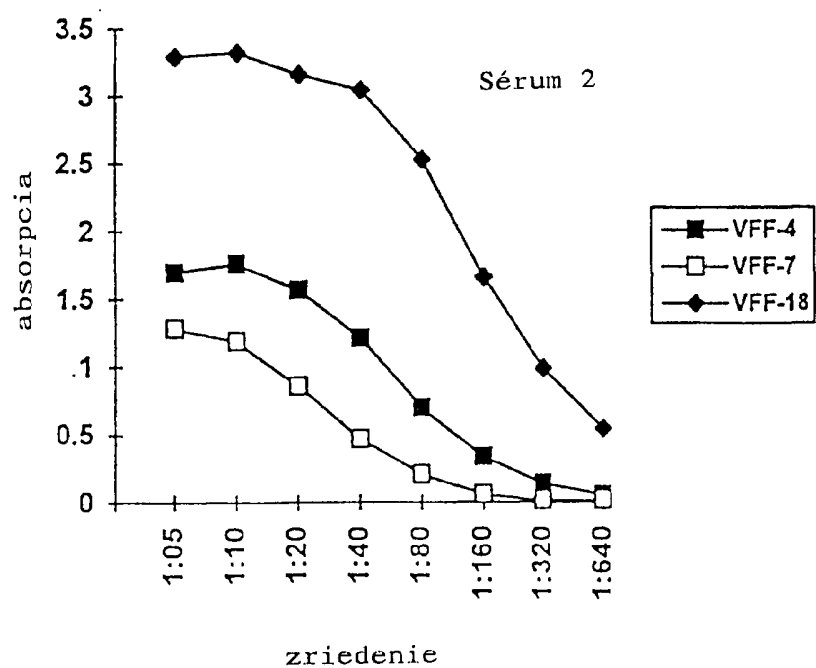


Obr. 4

6/7

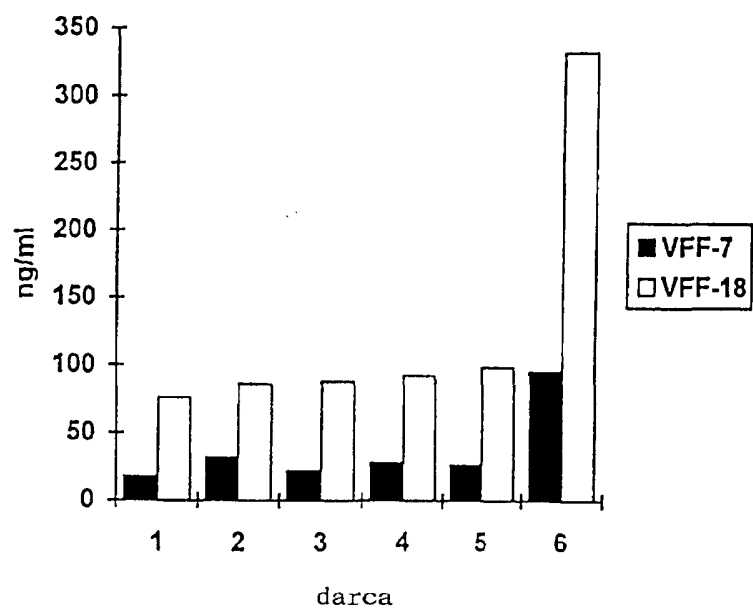


Obr. 5a



Obr. 5b

7/7



Obr. 6

Koniec dokumentu