

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **1996-698**
(22) Přihlášeno: **07.09.1994**
(30) Právo přednosti: **07.09.1993 US 1993/117366**
14.10.1993 US 1993/136783
(40) Zveřejněno: **16.10.1996**
(Věstník č. 10/1996)
(47) Uděleno: **14.10.2005**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.12.2005**
(Věstník č. 12/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/US1994/010308**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1995/007301**

(11) Číslo dokumentu:

295 928

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 K 16/24 **C 12 N 15/13**
C 07 K 16/46 **A 61 K 39/395**
C 07 K 17/02
C 07 H 15/12
G 01 N 33/53
C 12 P 21/08
C 12 N 5/10
C 12 N 5/20

(73) Majitel patentu:

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US
SMITHKLINE BEECHAM p.l.c., Brentford, GB

(72) Původce:

Holmes Stephen Dudley, Epsom, GB
Gross Mitchell Stuart, Wayne, PA, US
Sylvester Daniel R., Phoenixville, PA, US

(74) Zástupce:

JUDr. Pavel Zelený, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

**Fúzní protein, oblast determinující
komplementaritu, molekula nukleové kyseliny a
její sekvence, protilátka, způsob její přípravy a
vyšetření, farmaceutický prostředek,
rekombinantní plazmid, hostitelská buňka a
způsob diagnózy**

(57) Anotace:

Jsou popsány fúzní protein s vazebnou specificitou pro lidský interleukinu-4 (IL4), oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového lehkého nebo těžkého řetězce, molekula nukleové kyseliny kódující CDR, humanizovaná a chimérní protilátka obsahující těžký a lehký řetězec, farmaceutický prostředek, který obsahuje fúzní protein, izolovaná sekvence nukleové kyseliny, rekombinantní plazmid, který zahrnuje takovou sekvenci, hostitelská buňka, která je transfekována rekombinantním plazmidem, způsob přípravy humanizované protilátky specifické pro lidský IL-4, způsob diagnózy alergií a jiných stavů spojených s nadměrnou produkcí imunoglobulinu E u člověka a způsob vyšetření monoklonálních protilátek proti lidskému IL4.

CZ 295928 B6

Fúzní protein, oblast determinující komplementaritu, molekula nukleové kyseliny a její sekvence, protilátka, způsob její přípravy a vyšetření, farmaceutický prostředek, rekombinantní plazmid, hostitelská buňka a způsob diagnózy

5

Oblast techniky

Tento vynález se obecně týká oblasti fúze proteinů. Vynález se zvláště týká fúzního proteinu s vazebnou specificitou pro lidský interleukin-4 (IL4), oblasti determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového lehkého nebo těžkého řetězce, molekuly nukleové kyseliny kódující CDR, humanizované a chiméřní protilátky obsahující těžký a lehký řetězec, farmaceutického prostředku, který obsahuje fúzní protein, izolované sekvence nukleové kyseliny, rekombinantního plazmidu, který zahrnuje takovou sekvenci, hostitelské buňky, která je transfekována rekombinantním plazmidem, způsobu přípravy humanizované protilátky specifické pro lidský IL-4, způsobu diagnózy alergií a jiných stavů spojených s nadměrnou produkcí imunoglobulinu E u člověka a způsobu vyšetření monoklonálních protilátek proti lidskému IL4.

Dosavadní stav techniky

20

Atopické alergické choroby spadají do rozsahu relativně lehkých onemocnění, jako je sezónní rhinitida a konjunktivitida, vážnějších chorob, jako je atopická dermatitida a atopické astma, a onemocnění ohrožujících život, jako je anafylaktický šok. Spojnicí těchto stavů je imunitní odezva těla na alergeny, přičemž odezva zahrnuje produkci imunoglobulinových E (IgE) protilátek u geneticky předem disponovaných jedinců (atopie). Inhibice produkce IgE byla dlouho cílem ve specifické imunoterapii alergických onemocnění za použití desenzibilizačních vakcín. Avšak v posledních letech bezpečnost a účinnost vakcín je brána v potaz, ale požadavek na snížení hladin IgE se neztrácí.

Interleukin 4 (IL4) je proteinový mediátor v lymfoidním systému. Studie lymfocytů z atopických jedinců ukazuje na přítomnost vyššího než obvyklého počtu T lymfocytů se schopností secernovat IL4 v odezvu na stimulaci a větší počet IL4 secernovaného po stimulaci.

Bylo zjištěno, že anti-IL4 protilátka inhibuje IgE, avšak nikoli IgG₁ nebo IgG_{2a} (Finkelman a kol., Ann. Rev. Immunol. 8, 303 /1990/) a produkci IL5 secernujících T buněk (Maggi a kol., J. Immunol. 148, 2142 /1992/). Kromě toho nedávné údaje ukazují, že IL4 může mít vliv na hromadění eosinofilů ve tkáni (viz Tepper a kol. 62, 457 /1990/, Tepper a kol. 57, 503 /1989/).

Tak nadále v oboru trvá potřeba vysoce afinitního IL4 antagonistu, který by snížil inflamaci vyvolanou eosinofilem, jak snížením proliferace buněk secernujících IL5, tak inhibicí aderenčního mechanismu, při kterém se eosinofily mohou hromadit ve tkáni, a může se používat pro ošetřování, prevenci nebo diagnóze alergických reakcí.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je fúzní protein s vazebnou specificitou pro lidský interleukin-4 (IL4), který zahrnuje oblasti determinující komplementaritu těžkého řetězce (CDRs), které mají aminokyselinovou sekvenci znázorněnou v SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24 nebo SEQ ID č. 26 a oblasti determinující komplementaritu lehkého řetězce (CDRs), které mají aminokyselinovou sekvenci znázorněnou v SEQ ID č. 16, SEQ ID č. 18, SEQ ID č. 20 nebo SEQ ID č. 28.

Předmětem tohoto vynálezu je též oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového těžkého řetězce, jejíž aminokyselinová sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z

- 5 a) ThrSerGlyMetGlyValSer: SEQ ID č. 22,
 b) HisIleTyrTrpAspAspAspLysArgTyrAsnProSerLeuLysSer: SEQ ID č. 24 a
 c) ArgGluThrValPheTyrTrpPheAspVal: SEQ ID č. 26,

10 jakož i oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového lehkého řetězce, jejíž aminokyselinová sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z

- a) LeuAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsn: SEQ ID č. 16,
 15 b) AlaAlaSerAsnLeuGluSer: SEQ ID č. 18,
 c) GlnGlnSerAsnGluAspProProArg: SEQ ID č. 28 a
 d) GlnGlnSerAsnGluAspProProThr: SEQ ID č. 20.

20 Předmětem tohoto vynálezu je také molekula nukleové kyseliny kódující oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového těžkého řetězce, jejíž sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z

- 25 a) ACT TCT GGT ATG GGT GTG GTG AGC: SEQ ID č. 21,
 b) CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC:
 SEQ ID č. 23,
 30 c) AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC: SEQ ID č. 25,
 d) ACC TCC GGT ATG GGT GTT TCC: SEQ ID č. 54,
 e) CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC AAA CGT TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC:
 35 SEQ ID č. 55 a
 f) CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC GAC GTT: SEQ ID č. 56,

40 stejně jako molekula nukleové kyseliny kódující oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového lehkého řetězce, jejíž sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z

- a) AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG ACC:
 SEQ ID č. 15,
 45 b) AAG GCC TCC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC:
 SEQ ID č. 53,
 c) GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT: SEQ ID č. 17,
 50 d) CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG: SEQ ID č. 19 a
 e) CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG: SEQ ID č. 27.

55 Předmětem tohoto vynálezu je rovněž humanizovaná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec vymezený svrchu, kde tato protilátka je charakterizována disociační konstantou rovnou

nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4, přičemž úseky základní struktury uvedeného těžkého řetězce a uvedeného lehkého řetězce jsou odvozeny od alespoň jedné zvolené lidské protilátky a aminokyselinové sekvence oblasti determinující komplementaritu každého z těchto řetězců jsou odvozené od nelidské neutralizující monoklonální protilátky specifické pro lidský IL4, která je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4.

Předmětem tohoto vynálezu je také chiméřní protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec vymezený svrchu, která je charakterizovaná disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4, přičemž aminokyselinové sekvence oblasti determinující komplementaritu každého řetězce jsou odvozené od nelidské neutralizující monoklonální protilátky specifické pro lidský IL4, která je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4.

Předmětem tohoto vynálezu je farmaceutický prostředek, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje svrchu vymezený fúzní protein a farmaceuticky přijatelnou nosnou látku.

Předmětem tohoto vynálezu je také izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je zvolena ze souboru sestávajícího ze

a) sekvence nukleové kyseliny kódující fúzní protein mající aminokyselinovou sekvenci znázorněnou v SEQ ID č. 14 nebo SEQ ID č. 12,

b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k a),

c) sekvence nukleové kyseliny z 18 nebo více nukleotidů schopných hybridizace s a) nebo b) za přísných podmínek a

d) fragmentu nebo analogu a), b) nebo c), který kóduje protein charakterizovaný specificitou pro lidský interleukin-4,

přičemž tato sekvence popřípadě obsahuje restriční místo, jakož i

izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je zvolena ze souboru sestávajícího ze

a) sekvence nukleové kyseliny kódující komplementaritu determinizující oblast (CDR), která má aminokyselinovou sekvenci vybranou ze souboru zahrnujícího SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24, SEQ ID č. 26, SEQ ID č. 16, SEQ ID č. 18, SEQ ID č. 20 nebo SEQ ID č. 28,

b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k a),

c) sekvence nukleové kyseliny z 18 nebo více nukleotidů schopných hybridizace s a) nebo b) za přísných podmínek a

d) fragmentu nebo analogu a), b) nebo c), který kóduje protein charakterizovaný specificitou pro lidský interleukin-4.

Předmětem tohoto vynálezu je též rekombinantní plazmid, který zahrnuje svrchu vymezenou sekvenci nukleové kyseliny.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž hostitelská buňka, která je transfekována rekombinantním plazmidem vymezeným svrchu.

Předmět tohoto vynálezu také obsahuje způsob přípravy humanizované protilátky specifické pro lidský interleukin-4, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje kultivaci buněčné linie transfeko-

vané rekombinantním plazmidem vymezeným svrchu za řízení vybraných regulačních sekvencí schopných řídit expresi v těchto buňkách.

5 Předmětem tohoto vynálezu je také způsob diagnózy alergií a jiných stavů spojených s nadměrnou produkcí imunoglobulinu E u člověka, jehož podstata spočívá v tom, že se vzorek biologické kapaliny uvede do styku s monoklonální protilátkou, vymezenou svrchu, proti lidskému IL4 s disociační konstantou nižší než $2,0 \times 10^{-10}$ M, která má vysoký titr pro lidský interleukin-4, a stanoví se výskyt vazby mezi uvedenou monoklonální protilátkou a lidským interleukinem-4.

10 Předmětem tohoto vynálezu je konečně způsob vyšetření monoklonálních protilátek vymezených svrchu proti lidskému IL4 s disociační konstantou nižší než $2,0 \times 10^{-10}$ M, které mají vysoký titr pro lidský interleukin-4, jehož podstata spočívá v tom, že se

15 a) připraví hybridom buněčné linie charakterizované sekrecí monoklonální protilátky proti lidskému interleukinu-4 a

b) tato hybridomová buněčná linie vyšetří aldehydem kondenzovaným na lidský interleukin-4 nebo s biotinylovaným lidským interleukinem-4.

20

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje různé protilátky, jejich fragmenty a fúzní proteiny, zejména humanizované protilátky, které jsou charakterizovány vazebnou specificitou pro lidský IL4, neutralizační aktivitou a vysokou afinitou pro lidský IL4, jak je tomu například u myši MAb 3B9 nebo u krysí MAb 6A1. Tyto produkty jsou vhodné v terapeutických a farmaceutických prostředcích pro léčbu alergických reakcí zprostředkovaných IL4 a IgE. Tyto produkty jsou také vhodné pro diagnostiku stavu zprostředkovaného IL4, která se provádí měřením hladin cirkulujícího endogenního IL4 u člověka (například za použití enzym-vázaného imunisorbentního testu (ELISA)).

30

1. Definice

35 „Fúzní protein“ označuje protein kódovaný fúzní molekulou, který může být získán expresí ve zvolené hostitelské buňce. Takovými fúzními proteiny jsou upravené protilátky, například chimérické nebo humanizované protilátky, nebo fragmenty protilátek, kterým chybí celý konstantní region imunoglobulinu nebo jeho část, například Fv, Fab nebo F(ab)₂ a podobně.

40 „Fúzní molekula“ označuje sekvenci nukleové kyseliny kódující regiony určující komplementaritu (CDR) z non-lidského imunoglobulinu, které jsou inzertovány do prvního fúzního partnera, který obsahuje lidské variabilní sekvence pracovního regionu. Podle potřeby je první fúzní partner operativně navázán na druhý fúzní partneru.

45 „První fúzní partner“ označuje sekvenci nukleové kyseliny kódující region lidského pracovního rámce nebo variabilní region lidského imunoglobulinu, ve které jsou nativní (neboli přirozené) CDR nahrazeny CDR donorové protilátky. Lidským variabilním regionem může být imunoglobulinový těžký řetězec, lehký řetězec (nebo oba řetězce), jejich analog nebo jejich funkční fragment. Takové CDR nebo úseky CDR, umístěné ve variabilním úseku protilátek (imunoglobulinů), mohou být stanoveny způsoby známými v oboru. Například Kabat a kol. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. vyd., U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health /1987/) uvádí pravidla pro lokalizování CDR. Kromě toho jsou 50 známy počítačové programy, které jsou vhodné pro identifikaci úseků a/nebo struktur CDR.

Výraz „vysoký titr“ označuje v souvislosti s protilátkou takovou protilátku, která má vazebnou afinitu pro lidský IL4 charakterizovanou hodnotou K_d , která je rovná nebo menší než 2×10^{-10} M.

55

„Vazebnou specificitou pro lidský IL4“ se rozumí vysoký titr (neboli afinita) pro lidský, nikoli však pro hovězí nebo myší, IL4.

5 „Druhý fúzní partner“ označuje jinou nukleotidovou sekvenci kódující protein nebo peptid, se kterou je první fúzní partner fúzován ve čtecím rámci nebo pomocí obvyklé spojovací sekvence (to znamená operativně vázán). Výhodně jím je imunoglobulin. Druhý fúzní partner může zahrnovat sekvenci nukleové kyseliny kódující celý konstantní úsek pro stejnou (to znamená homologní – první a druhý fúzní protein jsou získány ze stejného zdroje) nebo jinou (to znamená heterologní) požadovanou protilátku. Může se jednat o těžký řetězec imunoglobulinu nebo o lehký řetězec imunoglobulinu (nebo o oba řetězce jako součást jediného polypeptidu). Druhý fúzní partner není omezen na konkrétní imunoglobulinovou třídu nebo izotyp. Kromě toho může druhý fúzní partner obsahovat část imunoglobulinového konstantního regionu, jako je tomu u Fab nebo F(ab)₂ (tj. samostatnou část vhodného lidského konstantního regionu nebo regionu pracovního rámce). Takový druhý fúzní partner může také obsahovat sekvenci kódující integrální membránový protein exponovaný na vnějším povrchu hostitelské buňky, například jako část fágové zobrazovací knihovny, nebo sekvence kódující protein pro analytické nebo diagnostické stanovení, jako je například křenová peroxidáza, β-galaktosidáza a podobně.

20 Výrazy Fv, Fc, Fab nebo F(ab)₂ se používají ve svém obvyklém významu (viz například Harlow a kol., *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory /1988/).

Termín „upravená protilátka“, jak je zde použit, označuje typ fúzního proteinu, tj. syntetickou protilátku (například chimérickou nebo humanizovanou protilátku), ve které je část variabilních domén lehkého a/nebo těžkého řetězce zvolené akceptorové protilátky nahrazena analogickými částmi z jedné nebo více donorových protilátek, které mají specificitu pro zvolený epitop. Například mohou takové molekuly zahrnovat protilátky charakterizované humanizovaným těžkým řetězcem spojeným s nemodifikovaným lehkým řetězcem (nebo chimérickým lehkým řetězcem) nebo naopak. Upravené protilátky mohou být také charakterizovány změnami sekvencí nukleové kyseliny kódujících variabilní domény pracovního rámečku lehkého a/nebo těžkého řetězce akceptorové protilátky, které vedou k zachování vazebné specificity protilátky. Tyto protilátky mohou obsahovat nahrazení jednoho nebo většího počtu CDR (výhodně všech) v akceptorové protilátce CDR z donorové protilátky, jako je zde dále popsáno.

35 „Chimérická protilátka“ označuje typ upravené protilátky, která obsahuje přirozeně se vyskytující variabilní region (lehkého řetězce nebo těžkého řetězce) z donorové protilátky, ve spojení s konstantními regiony lehkého a těžkého řetězce z akceptorové protilátky.

40 „Humanizovaná protilátka“ označuje typ upravené protilátky, která má své CDR získané z non-lidského donorového imunoglobulinu, přičemž zbývající imunoglobulinové části molekuly jsou získané z jednoho (nebo více) lidských imunoglobulinů. Také mohou být pozměněny zbytky vytvářející pracovní rámec, aby se zachovala vazebná afinita (viz například Queen a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 10029–10032 /1989/ a Hodgson a kol., *Bio/Technology* 9, 421 /1991/).

45 Výraz „donorová protilátka“ označuje protilátku (polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní), která přispívá sekvencemi nukleové kyseliny pro své variabilní regiony, CDR nebo jiné funkční fragmenty nebo jejich analogy, k prvnímu fúznímu partnerovi, za zisku fúzní molekuly a následně exprimovaného fúzního proteinu s antigenní specificitou a neutralizační aktivitou donorové protilátky. Jednou donorovou protilátkou vhodnou pro použití podle tohoto vynálezu je non-lidská neutralizační monoklonální protilátka (tj. myší protilátka) označená jako 3B9. Protilátka 3B9 je definována jako vysoce afinitní neutralizační protilátka izotypu IgG₁ specifická pro lidský IL4 (to znamená nerozpoznávající hovězí nebo myší IL4), která má DNA a aminokyselinové sekvence pro variabilní lehký řetězec SEQ ID č. 1 a 2 a DNA a aminokyselinové sekvence pro variabilní těžký řetězec SEQ ID č. 3 a 4, na vhodném myším IgG konstantním regionu.

Výraz „akceptorová protilátka“ označuje protilátku (polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní) heterologní k donorové protilátce, ze které jsou získány celé (nebo části, ale výhodně celé) sekvence nukleové kyseliny kódující pracovní regiony těžkého a/nebo lehkého řetězce a/nebo konstantní regiony těžkého a/nebo lehkého řetězce, čímž se získá druhý fúzní partner. Výhodně je akceptorovou protilátkou lidská protilátka.

„CDR“ jsou definovány jako regiony určující komplementaritu aminokyselinových sekvencí protilátky, kterými jsou hypervariabilní úseky imunoglobulinových těžkých a lehkých řetězců (viz Kabat a kol., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. vyd., U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health /1987/). Ve variabilních regionech imunoglobulinu existují tři CDR těžkého řetězce a tři CDR lehkého řetězce (nebo CDR regiony). Termín „CDR“, jak se zde používá, tedy označuje všechny tři CDR těžkého řetězce nebo všechny tři CDR lehkého řetězce (nebo jak všechny CDR těžkého řetězce, tak všechny CDR lehkého řetězce, pokud je to vhodné).

CDR poskytují většinu kontaktních zbytků pro navázání protilátky na antigen nebo epitop. CDR vhodné pro použití v tomto vynálezu jsou odvozeny od variabilních sekvencí těžkých a lehkých řetězců donorové protilátky a zahrnují analogy přirozeně se vyskytujícími CDR, kde tyto analogy mají stejnou vazebnou specifitu pro antigen a/nebo neutralizační schopnost jako donorová protilátka, ze které jsou získány.

Výrazem „sdílet vazebnou specifitu nebo neutralizační aktivitu pro antigen“ se rozumí například to, že ačkoliv může být MAb 3B9 charakterizována určitou úrovní afinity k antigenu, a CDR kódovaný sekvencí nukleové kyseliny 3B9 může mít ve vhodném strukturním prostředí nižší nebo vyšší afinitu, tak CDR 3B9 v takovém prostředí rozpozná stejný epitop jako 3B9. Příkladný CDR těžkého řetězce 3B9 je tvořen SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24 a SEQ ID č. 26 a příkladný CDR lehkého řetězce 3B9 je tvořen SEQ ID č. 16, SEQ ID č. 18 a SEQ ID č. 20.

„Funkčním fragmentem“ je část variabilní sekvence těžkého nebo lehkého řetězce (například sekvence obsahující malé delece na koncové amino- nebo karboxy- konci variabilního regionu imunoglobulinu), za zachování stejné vazebné specifity pro antigen a/nebo neutralizační schopnosti, jako má protilátka, ze které je fragment odvozen.

„Analogem“ je aminokyselinová sekvence modifikovaná alespoň jednou aminokyselinou, kde tato modifikace může být chemická, substituční nebo způsobená přeskupením několika aminokyselin (ne více než 10), kde modifikace dovoluje aminokyselinové sekvenci zachovat si biologické charakteristiky, například specifitu pro antigen a vysoký titr nebo afinitu, nemodifikované sekvence. Například mohou být vytvořeny silentní mutace, pomocí substitucí, které slouží pro vytvoření restričních míst pro endonukleasy v nebo poblíž CDR regionů.

Analogy mohou také vznikat jako alelické variace. Výraz „alelická variace nebo modifikace“ označuje změnu v sekvenci nukleové kyseliny kódující aminokyselinové nebo peptidové sekvence podle tohoto vynálezu. Takové variace nebo modifikace mohou být důsledkem degenerace genetického kódu nebo mohou být záměrně konstruovány k získání požadovaných charakteristik. Tyto variace nebo modifikace mohou nebo nemusí mít za výsledek změny v kódované aminokyselinové sekvenci. Například, aminokyselinové sekvence CDR lehkého řetězce SEQ ID č. 16 jsou identické pro nativní myši a humanizovanou 3B9 protilátku. Tato CDR sekvence je však kódována jak SEQ ID č. 15, tak SEQ ID č. 53. Podobně, CDR SEQ ID č. 22 je kódována jak SEQ ID č. 21, tak SEQ ID č. 54; CDR SEQ ID č. 24 je kódována jak SEQ ID č. 23, tak SEQ ID č. 55; a CDR SEQ ID č. 26 je kódována jak SEQ ID č. 25, tak SEQ ID č. 56.

Výraz „efektorové prostředky“ označuje neproteinové nosiče, se kterými mohou být fúzní proteiny a/nebo přirozené nebo syntetické lehké nebo těžké řetězce donorové protilátky, nebo jiné fragmenty donorové protilátky, asociovány za použití obvyklých prostředků. Takové neproteinové nosiče zahrnují běžné nosiče používané v diagnostice, například polystyrenové nebo jiné plas-

5 tové korálky, polysacharidy, například jak je tomu v systému BIAcore (Pharmacia), nebo jiné neproteinové substance používané v lékařské oblasti, které jsou bezpečné pro podávání lidem a zvířatům. Mezi další efektorové prostředky patří makrocycly pro chelatizaci atomů těžkých kovů, nebo radioizotopy. Tyto efektorové prostředky mohou být vhodné ke zvýšení poločasu fúzních proteinů, jak to způsobuje například polyethylenglykol.

II. Vysoce afinitní monoklonální protilátky proti IL4

10 Pro použití při konstrukci protilátek, fragmentů a fúzních proteinů podle tohoto vynálezu se mohou použít non-lidské druhy (například skot, ovce, primáti, hlodavci, jako například myši a krysy, a podobně), ve kterých se vytvoří požadovaný imunoglobulin, po imunizaci přirozeným lidským IL4 nebo jeho peptidovým epitopem. Běžné techniky hybridomů se použijí pro získání hybridních buněčných linií secernujících non-lidské MAb k IL4. Takové hybridomy se potom vyšetřují za použití IL4 kovalentně navázaného na 96-jamkové plotny nebo za použití biotinylovaného IL4, jak je popsáno podrobně v příkladu 2, dále. Jedním znakem tohoto vynálezu je tedy způsob detekce MAb k lidskému IL4, kde při tomto způsobu testování nedochází k denuraci IL4. Bylo zjištěno, že tímto způsobem mohou být detekovány vysoce afinitní (s vysokým titrem) MAb k lidskému IL4.

20 Jako první příklad je popsána produkce neutralizační Mab s vysokou afinitou z myšičího donoru. MAb 3B9, který je vhodnou myšičí (donorovou) protilátkou pro použití při výrobě chimérické nebo humanizované protilátky, je popsána podrobně v příkladu 1, který je uveden dále. 3B9 MAb je charakterizována vazebnou specificitou pro lidský IL4, s hodnotou K_d menší než $2,0 \times 10^{-10}$ M (přibližně $1,8 \times 10^{-10}$ M) pro IL4. Hodnota K_d pro fragment Fab této 3B9 pro IL4 je menší než
25 přibližně 3×10^{-10} M. Epitop této protilátky nebyl mapován na IL4 při použití lineárních peptidů, a proto se tento epitop pokládá za nekontinuální epitop. Charakter vazby ukazuje na vazebné místo na B-C smyčce (zbytky 60 až 69) → C závit (zbytky 70 až 93). Tyto regiony jsou označeny na mapě uvedené v Cook a kol., *J. Mol. Biol.* **218**, 675–678 /1991/, Walter a kol., *J. Biol. Chem.* **267**, 20371–20376 /1992/, Wlodaver a kol., *FEBS Lett.* **309**, 59–64 /1992/, Redfield a kol.,
30 *Biochem.* **30**, 11029–11035 /1991/, Smith a kol., *J. Mol. Biol.* **224**, 899–904 /1992/, Garrett a kol. /1992/ a Powers a kol., *Biochem.* **31**, 4334–4346 /1992/ a *Science* **256**, 1673–1677 /1992/, které se zde uvádějí jako součást stavu techniky.

35 Jinou žádoucí donorovou protilátkou je krysí MAb, 6A1. Způsob přípravy této MAb je uveden v příkladu 7 dále. Tato MAb je charakterizována tím, že jde o IgG_{2a} a má disociační konstantu pro hIL4 menší než $2,0 \times 10^{-10}$ M (přibližně $1,6 \times 10^{-10}$ M). Jako u 3B9 není cílový epitop této 6A1 mapován při použití IL4 lineárních peptidů, a epitop se proto pokládá za nekontinuální a trojrozměrný. Charakter vazby na IL4 muteiny a její biologická aktivita ukazují na vazbu v D helixovém regionu lidského IL4 (aminokyselinové zbytky 109 až 127), nepravděpodobněji
40 okolo tyrosinu na aminokyselinovém zbytku # 124.

Tento vynález není omezen na použití 3B9 MAb, 6A1 MAb nebo jejich hypervariabilních (to znamená CDR) sekvencí. Jakákoli jiná vhodná vysoce afinitní protilátka k IL4, který je charakterizován disociační konstantou rovnou nebo menší než $2,0 \times 10^{-10}$ M pro lidský IL4 a příslušnými anti-IL4 CDR, může být použita jako jejich náhrada. Kdekoli v následujícím popisu je donorová protilátka uvedena jako 3B9 nebo 6A1, tak je uvedena pouze pro ilustraci a zjednodušení popisu.

III. Protilátkové fragmenty

50 Tento vynález také zahrnuje použití Fab fragmentů $F(ab')_2$ fragmentů odvozených od MAb proti lidskému IL4. Tyto fragmenty jsou vhodné jako činidla in vivo účinná při stavech zprostředkovaných IL4 a IgE nebo in vitro jako součást detekce IL4. Fragment Fab obsahuje celý lehký řetězec a amino-koncovou část těžkého řetězce. Fragment $F(ab')_2$ je fragment tvořený dvěma
55 fragmenty Fab, které jsou vázány disulfidovými vazbami. MAbs 3B9, 6A1 a jiné podobné vysoce

afinitní protilátky vážící IL4 mohou být zdroji fragmentů Fab a F(ab')₂, které se mohou získat obvyklými způsoby, například štěpením MAb vhodnými proteolytickými enzymy, papainem a/nebo pepsinem, nebo rekombinantními způsoby. Tyto fragmenty Fab a F(ab')₂ jsou samy použitelné jako terapeutické, profylaktické nebo diagnostické prostředky a jako donory sekvencí zahrnujících variabilní regiony a CDR sekvence vhodné pro tvorbu rekombinantních nebo humanizovaných protilátek, jak je zde popsáno.

IV. Anti-IL4 aminokyselinové a nukleotidové sekvence

MAb 3B9 nebo jiné protilátky popsané výše mohou přispívat sekvencemi, jako jsou peptidové sekvence variabilních regionů těžkého a/nebo lehkého řetězce, pracovní sekvence, CDR sekvence, jejich funkční fragmenty a analogy, a jejich kódující sekvence nukleové kyseliny, které jsou použitelné při navrhování a získávání různých fúzních proteinů (včetně upravených protilátek), které jsou charakterizovány antigenní vazebnou specificitou donorové protilátky.

Jako jeden příklad tento vynález poskytuje sekvence variabilního regionu lehkého řetězce a variabilního regionu těžkého řetězce z myši IL4 protilátky 3B9 a sekvence od nich odvozené. Variabilní region těžkého řetězce 3B9 je charakterizován aminokyselinovými zbytky 20 až 140 SEQ ID č. 4. CDR úseky jsou na obr. 2 podtržené a jsou uvedeny v SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24 a SEQ ID č. 26. Variabilní region lehkého řetězce 3B9 je charakterizován aminokyselinovými zbytky 21 až 132 na obr. 1 (SEQ ID č. 2). CDR regiony jsou z aminokyselinových zbytků 44 až 58 (SEQ ID č. 16), 74 až 80 (SEQ ID č. 18) a 113 až 121 (SEQ ID č. 20).

Vynález poskytuje variabilní region chimérického těžkého řetězce a signální nukleotidové a aminokyselinové sekvence. Tyto sekvence jsou identické s 3B9 těžkým řetězcem s výjimkou signální sekvence. Signální sekvence chimérického těžkého řetězce je uvedena v SEQ ID č. 5 a 6. CDR regiony jsou na obr. 3 podtržené a jsou identické v aminokyselinové sekvenci s přirozenými myšimi CDR (SEQ ID č. 21 až 26). Nukleotidové a aminokyselinové sekvence variabilního regionu chimérického lehkého řetězce jsou identické s nemoifikovanou 3B9 sekvencí (aminokyselinové zbytky 21 až 132 SEQ ID č. 2), což umožňuje použití přirozených myších signálních sekvencí (aminokyselinové zbytky 1 až 20 SEQ ID č. 2).

Variabilní regiony humanizovaného těžkého řetězce a signální sekvence jsou uvedeny na obr. 4 (SEQ ID č. 11 a 12). Signální sekvence je také uvedena v SEQ ID č. 5 a 6. Jiné vhodné signální sekvence, které jsou známé odborníkovi v oboru, mohou být nahrazeny signálními sekvencemi, jejichž příklady jsou zde uvedeny. Aminokyselinové sekvence CDR tohoto konstruktu jsou identické s přirozenými myšimi CDR a CDR chimérického těžkého řetězce a jsou uvedeny v SEQ ID č. 22 (kódované SEQ ID č. 54), SEQ ID č. 24 (kódované SEQ ID č. 55) a SEQ ID č. 56 (kódované SEQ ID č. 26).

Příkladná (syntetická) variabilní sekvence humanizovaného lehkého řetězce je uvedena na obr. 5 (SEQ ID č. 13 a 14). Signální sekvence je v rozsahu aminokyselinových zbytků 1 až 19 SEQ ID č. 8. CDR sekvence z tohoto obr. jsou označeny podtržením a odlišují se od přirozených myších CDR jedinou aminokyselinou ze SEQ ID č. 20. Tak jsou CDR humanizovaného lehkého řetězce uvedeny v SEQ ID č. 53 a 16, SEQ ID č. 17 a 18 a SEQ ID č. 27 a 28. Tento rozdíl je popsán podrobně v příkladu 3.

Sekvence nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu nebo jejich fragmenty, kódující peptidové sekvence pro variabilní regiony lehkého řetězce a těžkého řetězce, se používají v nemoifikované formě nebo se syntetizují tak, aby obsahovaly žádoucí modifikace, například restriční místa. Izolované přirozené se vyskytující nebo alternativně syntetické sekvence nukleové kyseliny, které jsou odvozeny od MAb 3B9 nebo od jiných požadovaných IL4 protilátek s vysokou afinitou, mohou volitelně obsahovat restriční místa, k usnadnění inzerce nebo ligace do vhodné sekvence nukleové kyseliny, jako je sekvence kódující pracovní region požadované protilátky, ligace s mu-

tovanými CDR nebo fúze se sekvencí nukleové kyseliny, která kóduje vybraného druhého fúzního partnera.

5 Pokud se bere v úvahu degenerace genetického kódu, mohou se konstruovat různé kódující sek-
 10 vence, které kódují aminokyselinové sekvence variabilních regionů těžkého a lehkého řetězce
 a CDR sekvence podle tohoto vynálezu, stejně jako jejich funkční fragmenty a analogy, které sdí-
 lejí antigenní specifitu donorové protilátky. Izolované sekvence nukleové kyseliny podle tohoto
 vynálezu, nebo jejich fragmenty, kódující peptidové sekvence variabilního řetězce nebo CDR, se
 15 mohou použít k přípravě fúzních proteinů, chimérických nebo humanizovaných protilátek, nebo
 jiných upravených protilátek podle tohoto vynálezu, pokud se operabilně kombinují s druhým
 fúzním partnerem.

15 Tyto sekvence jsou také vhodné pro mutagenní zavedení specifických změn do sekvencí nukleo-
 vé kyseliny kódujících CDR nebo pracovní regiony a pro inkorporaci výsledné modifikované
 nebo fúzní sekvence nukleové kyseliny do plazmidu pro expresi. Například, silentní substituce
 v nukleotidové sekvenci pracovních regionů a CDR kódujících regionů se používají k vytvoření
 míst pro restriční enzymy, které usnadňují inzerci mutovaných CDR regionů (a/nebo pracovních
 regionů). Tyto CDR regiony se používají při konstrukci humanizované protilátky podle tohoto
 20 vynálezu.

20 Mělo by se poznamenat, že kromě izolovaných sekvencí nukleové kyseliny kódujících části
 fúzního proteinu a protilátek zde popsanych se mohou používat jiné takové sekvence nukleové
 kyseliny, jako sekvence komplementární k přirozeným sekvencím. Vhodné DNA sekvence zahr-
 25 nují sekvence, které hybridizují za přísných hybridizačních podmínek (viz T. Maniatis a kol.,
 Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, str. 387 až 389
 /1982/) na DNA sekvence. Jako jeden příklad takových přísných hybridizačních podmínek se
 uvádí hybridizace při 4XSSC za teploty 65 °C a potom promytí v 0,1XSSC za teploty 65 °C
 během 1 hodiny. Jiným příkladem přísných hybridizačních podmínek je 50% formamid, 4XSSC
 30 za teploty 42 °C. Výhodně mají tyto hybridizující DNA sekvence délku alespoň přibližně 18 nuk-
 leotidů, tj. přibližně velikost CDR.

V. Fúzní molekuly a fúzní proteiny

35 Fúzní molekuly mohou kódovat fúzní proteiny, které zahrnují upravené protilátky, jako chiméric-
 ké protilátky a humanizované protilátky. Vhodná fúzní molekula obsahuje CDR sekvence kódu-
 jící peptidy, které mají antigenní specifitu IL4 protilátky, výhodně protilátky s vysokou afinitou
 podle tohoto vynálezu, inzertovanou do prvního fúzního partnera (pracovního nebo variabilního
 regionu lidského imunoglobulinu).

40 Výhodně je první fúzní partner operativně navázán na druhý fúzní partner. Druhý fúzní partner je
 definován výše a může zahrnovat sekvenci kódující požadovaný region druhé protilátky, napřík-
 lad Fc region. Druhý fúzní partner může také obsahovat sekvence kódující jiné imunoglobuliny,
 se kterými se konstantní regiony lehkého nebo těžkého řetězce fúzují ve čtecím rámci nebo po-
 45 mocí spojovací sekvence. Upravené protilátky proti funkčním fragmentům nebo analogům IL4
 mohou být navrženy tak, aby vyvolaly zesílenou vazbu se stejnou protilátkou.

Druhý fúzní partner může být také navázán na efektorová činidla, jak jsou vymezena výše, mezi
 která patří neproteinové nosiče, se kterými může být druhý fúzní partner operativně vázán obvyk-
 50 lými způsoby.

Fúze neboli vazba mezi druhým fúzním partnerem, například protilátkovou sekvencí, a efektoro-
 vým činidlem, může být provedena libovolným vhodným způsobem, například pomocí obvyk-
 55 lých kovalentních nebo iontových vazeb, fúzemi proteinů nebo hetero-bifunkčními zesilujícími
 spojovacími činidly, jako je karbodiimid, glutaraldehyd a podobně. Takové technické postupy
 jsou známé v oboru a jsou již popsány v obvyklých chemických a biochemických textech.

Dále mohou být do fúzní molekuly zapracovány běžné spojovací sekvence, které jednoduše poskytují požadované množství prostoru mezi druhým fúzním partnerem a efektorovým činidlem. Výběr takových spojovacích činidel je dobře znám odborníkovi v oboru.

5

Dále, signální sekvence pro molekuly podle tohoto vynálezu se mohou modifikovat tak, aby zvyšovaly expresi. Příklad požadovaného fúzního proteinu, jenž obsahuje aminokyselinovou sekvenci z myši sekvence těžkého řetězce, která je identická s chimérickým variabilním těžkým řetězcem (V_H) z obr. 2 (SEQ ID č. 4), má nahrazen původní signální peptid jinou signální sekvencí (aminokyselinové zbytky 1 až 20, SEQ ID č. 6).

10

Příklad fúzního proteinu obsahuje peptidovou nebo proteinovou sekvenci variabilního těžkého a/nebo lehkého řetězce mající antigenní specifitu MAb 3B9, například V_H (aminokyselinové zbytky 21 až 141 SEQ ID č. 9 a 10) a V_L řetězce (aminokyselinové zbytky 21 až 132 SEQ ID č. 1 a 2). Ještě jiný vhodný fúzní protein podle tohoto vynálezu je charakterizován aminokyselinovou sekvencí obsahující alespoň jeden a výhodně všechny CDR variabilního regionu těžkých a/nebo lehkých řetězců z molekuly 3B9 myši protilátky, a zbývající sekvence, které jsou lidského původu, nebo jejich funkční fragmenty nebo analogy. Viz například humanizované V_H a V_L regiony SEQ ID č. 11 a 12 a SEQ ID č. 13 a 14 (obr. 4 a 5).

15

20

V ještě jiném provedení může být upravená protilátka podle tohoto vynálezu navázána na další činidlo. Například se může použít způsob rekombinantní DNA technologie k přípravě protilátky podle tohoto vynálezu, ve které je Fc fragment nebo CH3 doména úplné molekuly protilátky nahrazen enzymem nebo jinou detekovatelnou molekulou (například polypeptidovou efektorovou nebo reportérovou molekulou).

25

Druhý fúzní partner může být také operativně navázán na neimunoglobulinový peptid, protein nebo jeho fragment heterologní k sekvenci obsahující CDR, která má antigenní specifitu myši 3B9. Výsledný protein může mít po expresi jak anti-IL4 antigenní specifitu, tak charakteristiky neimunoglobulinové molekuly. Touto charakteristikou fúzního partnera může být například funkční charakteristika, jako je jiná vazebná nebo receptorová doména, nebo terapeutická charakteristika, když je fúzní partner sám terapeutickým proteinem, nebo další antigenní charakteristika.

30

Jiný žádoucí protein podle tohoto vynálezu může obsahovat úplnou molekulu protilátky, která má kompletní těžký nebo lehký řetězec, nebo jejich diskrétní fragment, jako je Fab nebo $F(ab')_2$ fragment, dimer těžkého řetězce nebo jejich libovolné minimální rekombinantní fragmenty, jako je F_v nebo jednořetězcová protilátka (SCA) nebo nějaká jiná molekula se stejnou specificitou jako má vybraná donorová MAb, například MAb 3B9 nebo 6A1. Takový protein může být použit ve formě fúzního proteinu nebo může být použit v nefúzované formě.

40

Kdykoli je druhý fúzní partner odvozen od jiné protilátky, například je pracovní region nebo konstantní region z imunoglobulinu jakékoliv třídy nebo izotypu, vzniká upravená protilátka. Upravené protilátky mohou obsahovat imunoglobulinové (Ig) konstantní regiony a variabilní pracovní regiony z jednoho zdroje, například akceptorové protilátky, a jeden nebo větší počet (výhodně všechny) CDR z donorové protilátky, například anti-IL4 protilátky zde popsané. Kromě toho mohou být připraveny změny na úrovni nukleových kyselin nebo aminokyselin, například delece, substituce nebo adice, v pracovním regionu variabilní domény lehkého a/nebo těžkého řetězce akceptorové Mab, nebo mohou být donorové CDR regiony upraveny za účelem uchování vazebné specificity pro antigen donorové protilátky.

45

50

Takové upravené protilátky jsou navrženy tak, aby využily jeden (nebo oba) variabilní regiony těžkého a/nebo lehkého řetězce IL4 MAb (popřípadě modifikované způsobem popsaným výše), nebo jeden nebo větší počet z dále identifikovaných CDR těžkého nebo lehkého řetězce (viz příklad 3). Upravené protilátky podle tohoto vynálezu jsou neutralizační, to znamená, že požadova-

55

ným způsobem blokuje vazbu IL4 proteinu na receptor. Například, upravená protilátka odvozená od MAb 3B9 je namířena proti specifickému terciárnímu proteinovému epitopu lidského IL4, o kterém se předpokládá, že je v regionu B-C smyčka → C helix, jak je popsáno výše.

- 5 Takové upravené protilátky zahrnují humanizovanou protilátku obsahující pracovní regiony zvoleného lidského imunoglobulinu nebo jeho subtypu, nebo chimérickou protilátku obsahující konstantní regiony lidského těžkého a lehkého řetězce fúzované k funkčním fragmentům IL4 protilátky. Vhodná lidská (nebo jiná zvířecí) akceptorová protilátka může být vybrána z obvyklé databáze, například databáze KABAT^(R), Los Alamos database, USA, a švýcarské Protein-Database, podle homologie s nukleotidovými a aminokyselinovými sekvencemi donorové protilátky. Lidská protilátka charakterizovaná homologií k pracovním regionům donorové protilátky (na aminokyselinové úrovni) může být vhodná k poskytnutí konstantního regionu těžkého řetězce a/nebo variabilního pracovního regionu lehkého řetězce pro inzerci donorových CDR. Vhodná akceptorová protilátka schopná poskytnout konstantní nebo variabilní pracovní regiony lehkého řetězce se může vybírat podobným způsobem. Je třeba uvést, že těžké a lehké řetězce akceptorové protilátky nemusí pocházet ze stejné akceptorové protilátky.

Je žádoucí, aby se heterologní pracovní regiony a konstantní regiony vybíraly ze tříd a izotypů lidských imunoglobulinů, jako je IgG (subtypy 1 až 4), IgM, IgA a IgE. Akceptorová protilátka nemusí obsahovat pouze lidské imunoglobulinové proteinové sekvence. Například může být připraven gen, ve kterém je DNA sekvence kódující část lidského imunoglobulinového řetězce fúzována na DNA sekvenci kódující ne-imunoglobulinovou aminokyselinovou sekvenci, jako polypeptidová efektorová nebo reportérová molekula.

25 Příklad zvláště vhodné humanizované protilátky obsahuje CDR 3B9 inzertované do pracovních regionů zvolené lidské protilátkové sekvence. Pro neutralizační humanizované protilátky se jeden, dva nebo výhodně tři CDR variabilních regionů těžkého řetězce a/nebo lehkého řetězce IL4 protilátky inzertují do pracovních regionů zvolené lidské protilátkové sekvence, kde nahradí přirozené CDR této protilátky.

30 Výhodně jsou v humanizované protilátce variabilní domény jak lidského těžkého, tak lehkého řetězce upraveny jednou nebo větším počtem náhrad CDR. Je možné použít všech šesti CDR nebo různých kombinací méně než šesti CDR. Výhodně se však nahrazuje všech šest CDR. Je možné nahradit CDR pouze v lidském těžkém řetězci, za použití nemodifikovaného lehkého řetězce z lidské akceptorové protilátky jako lehkého řetězce. Ještě další alternativa spočívá v tom, že se kompatibilní lehký řetězec může zvolit z jiné lidské protilátky za pomoci obvyklé databáze protilátek. Zbytek upravené protilátky může být získán z libovolného vhodného akceptorového lidského imunoglobulinu.

40 Upravená humanizovaná protilátka tak má výhodně strukturu přirozené lidské protilátky nebo jejího fragmentu a má kombinaci vlastností vyžadovaných pro účinné terapeutické použití, například pro léčbu zánětlivých chorob zprostředkovaných IL4 u člověka nebo pro diagnostická použití.

45 Jiným příkladem je upravená protilátka obsahující tři CDR variabilního regionu lehkého řetězce 3B9 (SEQ ID č. 16, 18, 20 a 28) a tři CDR variabilního regionu těžkého řetězce 3B9 (SEQ ID č. 22, 24 a 26). Výsledná humanizovaná protilátka je charakterizována antigenní vazebnou specificitou a vysokou afinitou MAb 3B9.

50 Odborník v oboru pochopí, že upravená protilátka může být dále modifikována změnami v aminokyselinách variabilní domény bez narušení specificity a vysoké afinity donorové protilátky (tj. vzniká tak analog). Například, byly zkonstruovány humanizované monoklonální protilátky, ve kterých je v lehkém řetězci aminokyselinovým zbytkem v poloze 120 arginin (SEQ ID č. 13 a 14) nebo threonin (SEQ ID č. 57 a 58). Předpokládá se, že aminokyseliny těžkého a lehkého

řetězce mohou být substituovány jinými aminokyselinami buď v pracovních regionech variabilní domény nebo CDR, nebo v obou.

5 Dále, konstantní region může být pozměněn za účelem zvýšení nebo snížení určitých vlastností molekul podle tohoto vynálezu, například dimerizací, vazbou na Fc receptory nebo schopností vázat a aktivovat komplement (viz například Angal a kol., *Mol. Immunol.* **30**, 105–108 /1993/, Xu a kol., *J. Biol. Chem.* **269**, 3469–3474 /1994/ a Winter a kol., EP 307 434B).

10 Fúzní protein, kterým je chimérická protilátka, se liší od humanizovaných protilátek popsaných výše tím, že obsahuje celé variabilní regiony těžkého řetězce a lehkého řetězce ne-humanizované donorové protilátky, včetně pracovních regionů, ve spojení s konstantními regiony lidského imunoglobulinu pro oba řetězce. Očekává se, že chimérické protilátky, které obsahují další non-lidské sekvence vzhledem k humanizovaným protilátkám podle tohoto vynálezu, mohou vyvolat signifikantní imunitní reakci u lidí.

15 Takové protilátky jsou vhodné při prevenci a léčbě alergických chorob zprostředkovaných IL4, jak je rozebráno dále.

20 VI. Způsob přípravy fúzních proteinů a upravených protilátek

Výhodně se při konstrukci fúzních proteinů a upravených protilátek, výhodně humanizovaných protilátek podle tohoto vynálezu, použijí sekvence variabilního lehkého a/nebo těžkého řetězce a CDR MAb 3B9 (SEQ ID č. 16, 18, 20, 22, 24 a 26) nebo jiné vhodné donorové MAb (například 6A1) a jejich kódující nukleotidové sekvence, za použití dále uvedeného způsobu. Stejně nebo podobné techniky se mohou také použít k přípravě jiných provedení tohoto vynálezu.

30 Hybridom produkující zvolenou donorovou MAb, například myší protilátku 3B9, se klonuje obvyklým způsobem, a DNA variabilních regionů těžkého a lehkého řetězce se získá technikami známými odborníkovi v oboru, například technikami, které popsal Sambrook a kol., *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory /1989/. Variabilní těžké a lehké regiony 3B9 obsahující alespoň CDR a ty části pracovního regionu variabilní domény lehkého a/nebo těžkého řetězce, které jsou nutné pro zachování vazebné specifity donorové Mab, stejně jako zbývající imunoglobulinové části protilátkového řetězce z lidského imunoglobulinu, se získají za použití polynukleotidových primerů a reverzní transkriptázy. CDR se identifikují za použití známé databáze a porovnáním s jinými protilátkami.

40 Potom se může připravit myší/lidská chimérická protilátka a ta se může testovat na vazebnou schopnost. Taková chimérická protilátka obsahuje celé V_H a V_L regiony non-lidské donorové protilátky, ve spojení s konstantními regiony lidského imunoglobulinu pro oba řetězce.

45 Homologní pracovní regiony variabilního regionu těžkého řetězce z lidské protilátky se identifikují za použití počítačových databází, například KABAT^(R), a lidská protilátka projevující homologii k 3B9 se vybere jako akceptorová protilátka. Sekvence syntetických variabilních regionů těžkého řetězce obsahující 3B9 CDR v pracovních regionech lidské protilátky se navrhy tak, aby obsahovaly volitelné nukleotidové substituce pro vložení restričních míst. Takto navržené sekvence se potom syntetizují za použití překrývajících se oligonukleotidů, amplifikují se polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a korigují se chyby.

50 Vhodné pracovní regiony variabilního regionu lehkého řetězce se navrhuji podobným způsobem.

55 Humanizovaná protilátka se může odvodit od chimérické protilátky nebo se může výhodně připravit synteticky inserováním CDR z těžkých a lehkých řetězců donorové Mab do vybraného pracovního regionu těžkého a lehkého řetězce. V jiném provedení se humanizovaná protilátka podle tohoto vynálezu může připravit za použití obvyklých technik mutagenese. Tak výsledná humanizovaná protilátka obsahuje lidské pracovní regiony a CDR donorové MAb. Ve zbytcích pracov-

ního regionu se mohou provést dodatečné manipulace. Výsledná humanizovaná protilátka může být exprimována v rekombinantních hostitelských buňkách, například COS nebo CHO buněk. Další detaily tohoto postupu jsou uvedeny v příkladu 4. Jiné humanizované protilátky se mohou připravit za použití tohoto technického postupu na jiných vhodných IL4-specifických neutralizačních non-humanizovaných protilátkách s vysokým titrem.

Běžný expresní vektor nebo rekombinantní plazmid se připraví umístěním těchto kódujících sekvencí pro fúzní protein do operativní asociace s běžnými regulačními kontrolními sekvencemi schopnými řízení replikace a exprese v hostitelské buňce a/nebo sekrece z hostitelské buňky. Regulační sekvence zahrnují promotorové sekvence, například CMV promotor, a signální sekvence, které mohou být získány z jiných známých protilátek. Podobně se připraví druhý expresní vektor obsahující DNA sekvenci, která kóduje komplementární lehký nebo těžký řetězec protilátky. Výhodně je tento druhý expresní vektor identický s prvním, s tou výjimkou, že kódující sekvence a volitelné signální znaky jsou uspořádány tak, aby byla co nejlépe zajištěna funkční exprese každého polypeptidového řetězce.

Zvolená hostitelská buňka se kotransfektuje obvyklými technickými postupy jak s prvními, tak s druhými vektory, nebo se jednoduše transfektuje jediným vektorem, aby se vytvořila transfektovaná hostitelská buňka podle tohoto vynálezu obsahující rekombinantní nebo syntetické lehké a těžké řetězce. Transfektovaná buňka se potom kultivuje obvyklými technickými způsoby za vzniku upravené protilátky podle tohoto vynálezu. Humanizovaná protilátka, ve které jsou spojeny rekombinantní těžký řetězec a lehký řetězec, se testuje v kultuře vhodným testem, jako je ELISA nebo RIA. Podobné běžné techniky se mohou použít ke konstrukci jiných fúzních proteinů a molekul podle tohoto vynálezu.

Vhodné vektory pro kroky klonování a subklonování, používané ve způsobech a konstrukci prostředků podle tohoto vynálezu, mohou být vybrány odborníkem v oboru. Například se mohou použít obvyklé pUC série klonovacích vektorů. Jedním z používaných vektorů je pUC19, který je komerčně dostupný od dodavatele, jako je Amersham (Buckinghamshire, Spojené Království) nebo Pharmacia (Uppsala, Švédsko). Pro klonování může být použit libovolný vektor, který se může snadno replikovat, má nadbytek klonovacích míst a obsahuje markerové geny, a dá se s ním snadno manipulovat. Výběr klonovacího vektoru tak není omezujícím činitelem tohoto vynálezu.

Podobně, vektory použité pro expresi upravených protilátek podle tohoto vynálezu, může vybrat odborník z oboru z libovolných obvyklých vektorů. Vektory také obsahují zvolené regulační sekvence, které jsou operativně navázané na DNA kódující sekvence imunoglobulinových regionů a jsou schopné řídit replikaci a expresi heterologních sekvencí DNA ve zvolených hostitelských buňkách, jako například CMV promotory. Tyto vektory obsahují výše popsané DNA sekvence, které kódují upravenou protilátku nebo fúzovanou molekulu. Podle jiného provedení vektory mohou obsahovat zvolené imunoglobulinové sekvence modifikované inzercí vhodných restričních míst pro snadnou manipulaci.

Expresní vektory mohou také obsahovat markerové geny vhodné pro amplifikování exprese heterologních DNA sekvencí, například gen savčí dihydrofolát-reduktázy (DNFR) nebo gen rezistence na neomycin (neo^R). Jiné výhodné vektorové sekvence obsahují poly A signální sekvenci, například z hovězího růstového hormonu (BGH) a β -globinovou promotorovou sekvenci (betaglopro). Expresní vektory vhodné podle zde popsaného řešení se mohou syntetizovat technikami dobře známými odborníkovi v oboru.

Složky takových vektorů, například replikony, selekční geny, zesilovače transkripce, promotory, signální sekvence a podobně, se mohou získat z přírodních zdrojů nebo se mohou připravit synteticky známými postupy a mohou být použity při řízení exprese a/nebo sekrece produktu z rekombinantní DNA ve zvoleném hostiteli. Pro tento účel mohou být vybrány také jiné vhodné

expresní vektory, kterých je v oboru známo mnoho pro savčí, bakteriální, hmyzí, kvasinkovou a mykotickou expresi.

5 Tento vynález také zahrnuje buněčnou linii transfektovanou rekombinantním plazmidem obsahujícím kódující sekvence upravených protilátek nebo jejich fúzních molekul. Hostitelské buňky vhodné pro klonování a jiné manipulace s těmito klonujícími vektory jsou také obvyklé. Nejlépe se pro replikaci klonujících vektorů a jiných stupňů při konstrukci fúzních proteinů podle tohoto vynálezu použijí buňky z různých kmenů *E. coli*.

10 Vhodné hostitelské buňky nebo buněčné linie pro expresi upravené protilátky nebo fúzního proteinu podle tohoto vynálezu jsou eukaryotické buňky, jako jsou mimo jiné CHO, COS, fibroblasty (například 3T3) a myeloidní buňky, přičemž nejvýhodnější je savčí buňka, jako CHO nebo myeloidní buňka. Mohou se používat lidské buňky, což umožňuje, aby molekula byla modifikována podle lidských glykosylačních vzorů. Alternativně se mohou používat jiné eukaryotické
15 buněčné linie. Výběr vhodných savčích hostitelských buněk a způsobů transformace, kultivace, amplifikace, testování, produkce produktu a jeho čištění, jsou známy v oboru, viz například Sambrook a kol., cit. výše.

20 Bakteriální buňky se mohou ukázat vhodné jako hostitelské buňky pro expresi rekombinantních MAb podle tohoto vynálezu. V důsledku tendence proteinů exprimovaných v bakteriálních buňkách k nesprávnému skládání (nebo neskládání) a vzhledem k tomu, že tyto proteiny nemusí být glykosylovány, je nutno jakoukoliv Mab produkovanou v bakteriální buňce testovat na zachování vazebné schopnosti k antigenu. Pokud se molekula exprimovaná bakteriální buňkou produkuje ve
25 správně složené formě, tak může být bakteriální buňka vhodným hostitelem. Například různé kmeny *E. coli* používané pro expresi jsou dobře známé jako hostitelské buňky v oblasti biotechnologií. Různé kmeny *B. subtilis*, *Streptomyces*, jiné bacily a podobně, se mohou také použít při tomto způsobu.

30 Pokud je to žádoucí, tak jsou kmeny kvasinkových buněk známé odborníkovi v oboru také dostupné jako hostitelské buňky, stejně jako buňky hmyzu, například *Drosophila* a *Lepidoptera*, a virové expresní systémy (viz například Miller a kol., *Genetic Engineering* 8, 277–298, Plenum Press /1986/ a citace zde uvedené).

35 Obecné způsoby, kterými se mohou konstruovat vektory podle tohoto vynálezu, transfekční metody nutné pro přípravu hostitelských buněk podle tohoto vynálezu a metody kultivace potřebné pro přípravu fúzního proteinu nebo upravené protilátky podle tohoto vynálezu z takové hostitelské buňky, jsou vždy obvyklými technickými postupy. Podobně, po přípravě jsou fúzní proteiny nebo upravené protilátky podle tohoto vynálezu čištěny z buněčné kultury obvyklými způsoby,
40 včetně srážení síranem amonným, na afinitních kolonách, chromatografií na koloně, gelovou elektroforézou a podobně. Takové technické postupy jsou známé odborníkovi v oboru a nejsou omezením tohoto vynálezu.

45 Ještě jiný způsob exprese humanizovaných protilátek může používat expresi v transgenním zvířeti, jako je popsána v patentu US 4 873 316. Uvedený patent se týká expresního systému využívajícího zvířecí kaseinový promotor, který – pokud se transgenně vpraví do savce – dovoluje samici produkovat požadovaný rekombinantní protein ve svém mléku.

Po expresi upravené protilátky vybranou metodou se tato protilátka testuje na aktivitu *in vitro* za použití vhodného testu. V současnosti se pro stanovení kvalitativní a kvantitativní vazby upravené protilátky na IL4 epitop používají běžné ELISA testy. Jiné testy *in vitro*, například BIAcore (Pharmacia), se mohou také použít k ověření neutralizační aktivity před následujícími klinickými
50 studiemi prováděnými na lidech, což dovoluje ohodnotit stabilitu upravené protilátky v těle navzdory obvyklým mechanismům eliminace.

Podle způsobů popsaných pro humanizované protilátky připravené z 3B9 může odborník v oboru také konstruovat humanizované protilátky z jiných donorových IL4 protilátek, sekvencí variabilních regionů a CDR peptidů zde popsaných. Upravené protilátky se mohou připravovat s variabilními pracovními regiony označovanými jako „vlastní“ pro příjemce upravené protilátky. Pro dosažení velkého zvýšení vazby na antigen bez příslušného zvýšení imunogenity pro příjemce se mohou provádět malé modifikace variabilního pracovního regionu. Takto upravené protilátky mohou účinně léčit stavy zprostředkované IL4 u lidí. Takové protilátky mohou také být vhodné při diagnostice takových onemocnění.

10 VII. Terapeutické/profylaktické použití

Tento vynález se také týká způsobu léčby lidí trpících alergických onemocněním. Způsob zahrnuje podávání účinné dávky protilátek, včetně jedné nebo více upravených protilátek nebo fúzních proteinů podle předkládaného vynálezu.

15 Terapeutická odpověď dosažená použitím molekul podle tohoto vynálezu vzniká v důsledku vazby na lidský IL4 s následným blokováním uvolňování o IgE. Tak jsou molekuly podle tohoto vynálezu, když jsou v přípravcích a prostředcích vhodných pro terapeutické použití, vysoce žádoucí pro osoby s alergickou reakcí, jako je alergická rhinitida, konjunktivitida, atopická dermatitida, atopické astma a anafylaktický šok.

Fúzované proteiny, protilátky, upravené protilátky nebo jejich fragmenty podle tohoto vynálezu se mohou také používat ve spojení s jinými protilátkami, zvláště s lidskými MAb reagujícími s jinými signálními znaky (epitopy) odpovědnými za stav, proti kterému je zaměřena upravená protilátka podle tohoto vynálezu. Podobně, MAb reaktivní s epitopy odpovědnými za stavy u vybraných zvířat, proti kterým jsou protilátky podle tohoto vynálezu namířeny, se mohou také používat se veterinárních prostředcích.

30 Předpokládá se, že terapeutické prostředky podle tohoto vynálezu jsou vhodné pro léčbu alergických stavů po dobu od přibližně 2 dnů do zhruba 3 týdnů nebo podle potřeby. Například, delší ošetřování může být žádoucí, pokud se ošetřuje sezónní rhinitida nebo podobná onemocnění. To představuje žádoucí výhodu oproti v současné době používanému infuznímu protokolu pro léčbu onemocnění zprostředkovaných IL4. Dávka a doba ošetřování souvisí s relativní dobou setrvání molekul podle tohoto vynálezu v oběhu člověka, a mohou být upraveny odborníkem v oboru v závislosti na léčeném onemocnění a celkovém zdravotním stavu pacienta.

Způsobem podávání terapeutického prostředku podle tohoto vynálezu může být libovolný vhodný způsob, který dopraví prostředek do pacienta. Fúzní proteiny, protilátky, upravené protilátky a jejich fragmenty a také farmaceutické prostředky podle tohoto vynálezu, jsou zvláště vhodné pro parenterální podávání, to znamená pro podávání subkutánně, intramuskulárně, intravenózně nebo intranasálně.

45 Terapeutické prostředky podle tohoto vynálezu se mohou připravit jako farmaceutické prostředky, které obsahují účinné množství upravené protilátky (například humanizované protilátky) podle tohoto vynálezu jako účinnou látku ve farmaceuticky přijatelném nosiči. V profylaktickém prostředku podle tohoto vynálezu se výhodně použije vodná suspenze nebo roztok obsahující upravenou protilátku, který je nejlépe pufrován na fyziologickou hodnotu pH, výhodně ve formě připravené pro injekce. Prostředky pro parenterální podání budou obvykle obsahovat roztok upravené protilátky podle tohoto vynálezu nebo její směs, rozpuštěné ve farmaceuticky přijatelném nosiči, výhodně ve vodném nosiči. Mohou se použít různé vodné nosiče, například 0,4% fyziologický roztok, 0,3% glycin a podobně. Tyto roztoky jsou sterilizovány a obvykle zbaveny hmoty ve formě částic. Tyto roztoky se mohou sterilizovat obvyklými, dobře známými technickými způsoby sterilizace (například filtrací). Prostředky mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné pomocné látky, které jsou nutné pro napodobení fyziologických podmínek, jako látky k úpravě hodnoty pH, pufrovací činidla a podobně. Koncentrace protilátky podle tohoto vynálezu v takovém

farmaceutickém prostředku se může široce měnit, to znamená od méně než přibližně 0,5 %, obvykle od 1 % nebo alespoň přibližně 1 %, až do 15 nebo 20 % hmotnostních, a bude vybrána především na základě objemů tekutin, viskozit atd., podle zvoleného způsobu podání.

5 Farmaceutický prostředek podle tohoto vynálezu pro intramuskulární injekci se tedy může připravit tak, že obsahuje 1 ml sterilní pufrované vody a od přibližně 1 ng do zhruba 100 mg, například od přibližně 50 ng do zhruba 30 mg nebo více, výhodně od přibližně 50 mg do zhruba 25 mg, upravené protilátky podle tohoto vynálezu. Podobně, farmaceutický prostředek podle tohoto
10 vynálezu pro intravenózní injekce se může připravit tak, že obsahuje přibližně 250 ml sterilního Ringerova roztoku a od přibližně 1 do zhruba 30 mg, výhodně od 5 do zhruba 25 mg upravené protilátky podle tohoto vynálezu. Aktuální metody pro přípravu prostředků podávaných parenterálně jsou dobře známé nebo budou zřejmé odborníkovi v oboru a jsou podrobněji popsány například v Remington's Pharmaceutical Science, 15. vyd., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA.

15 Je výhodné, aby byl terapeutický prostředek podle tohoto vynálezu, pokud je ve formě farmaceutického prostředku, připraven ve formě dávkových jednotek. Vhodnou terapeuticky účinnou dávku může snadno stanovit odborník v oboru. K účinné léčbě zánětlivých onemocnění u lidí nebo jiných živočichů se má v jedné dávce podat od přibližně 0,1 do zhruba 20 mg proteinu nebo
20 protilátky podle tohoto vynálezu na 70 kg tělesné hmotnosti parenterální cestou, výhodně intramuskulárně (i.m.). Taková dávka se může, pokud je to nutné, opakovat v příslušných časových intervalech, jak jsou zřejmé ošetřujícím lékařům, během zánětlivé reakce.

Tento vynález také zahrnuje podávání IL4 fúzních proteinů podle tohoto vynálezu souběžně nebo
25 postupně s jinými protilátkami nebo fúzního proteiny s anti-IL4 aktivitou, jako je aktivita proti tumor-nekrosis faktoru nebo jiná farmaceutická aktivita kompatibilní s vazbou fúzních proteinů podle tohoto vynálezu na IL4 receptor. Takové jiné protilátky jsou dostupné komerčně nebo mohou být navrženy způsobem, který je podobný jako je zde popsáno.

30 Fúzní proteiny a upravené protilátky podle tohoto vynálezu se mohou také používat v diagnostických režimech, jako pro diagnostikování chorob zprostředkovaných IL4 nebo pro sledování léčby takových chorob. Jako diagnostická činidla se tyto fúzní proteiny mohou běžně značit pro použití v ELISA nebo jiných obvyklých testech pro testování hladin IL4 v séru, plazmě nebo jiné vhodné tkáni. Typ testu, ve kterém se používají fúzní proteiny, není omezením tohoto vynálezu.

35 Protilátky, upravené protilátky nebo jejich fragmenty zde popsané se mohou lyofilizovat pro skladování a mohou se rekonstituovat před použitím ve vhodném nosiči. Tento technický postup se ukázal být účinným u obvyklých imunoglobulinů. Mohou se používat v oboru známé lyofilizační a rekonstituční technické způsoby.

40

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují různé aspekty předkládaného vynálezu, včetně popisu přípravy
45 upravených protilátek a jejich exprese ve vhodných vektorech a hostitelských buňkách, a tyto příklady nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu. Veškeré aminokyseliny jsou označeny běžným třípísmenným nebo jednopísmenným kódem. Všechny potřebné restriční enzymy, plazmidy další činidla a materiály byly získány z komerčních zdrojů, pokud není uvedeno jinak. Všechny obecné klonovací ligace a další postupy rekombinantní DNA technologie byly provedeny podle T. Maniatis a kol., výše, nebo podle druhého vydání této knihy (1989), vyd. Sambrook a kol., stejný vydavatel („Sambrook a kol.“).

50

Příklad 1

Způsob přípravy Mab 3B9

A. Imunizační postup

Čtyři myši (F1 hybridy Balb/c a C57BL/6) se imunizují subkutánně 50 µg rekombinantního E. coli lidského IL4 ve Freudově kompletním adjuvans a o 4 týdny později uvedou do styku s 50 µg IL4 ve Freudově nekompletním adjuvans, zavedeném intraperitoneálně (i.p.). Na základě dobrého titru sérové protilátky vůči IL4 jedna myš se dále imunizuje 200 µg IL4 (i.p. ve fyziologickém roztoku) za 8 týdnů, o 2 dny později 100 µg IL4 (i.p. ve fyziologickém roztoku) a o 2 dny později 50 µg IL4 (i.p. ve fyziologickém roztoku). Za 2 dny po konečné imunizaci se provede splenektomie.

B. Způsob fúze a systém vyšetření

Buňky sleziny myši se použijí pro přípravu hybridomů (normalizovaných postupem, například jak popsal Kohler a kol. v Nature 256, 495 /1975/), ze kterých se více než 250 klonů buněk vyšetřuje na sekreci protilátky k IL4, za použití komerčně dostupného BIAcore systému a testů ELISA popsaných dále, pro vázání IL4. Pozitivní odezvu poskytne pět jamek. Pouze jeden klon z myši, 3B9, je silně pozitivní. Všechny sekundární klony odvozené od 3B9 jsou pozitivní.

Příklad 2

Testování ELISA a afinitní konstanty

A. Způsob testování ELISA

Vyšetření testováním, prováděné jak je popsáno dále, je určeno k měření afinity pro přírodní lidský IL4. Pro experiment 1 se deska s 96 jamkami aktivovaná aldehydem povleče IL4 v koncentraci 1 µg/ml, 100 µl/jamka, v 0,1 M borátovém pufru, o hodnotě pH 8,5, a inkubuje přes noc za teploty místnosti. hIL4 se kovalentně váže k desce. Roztok IL4 se odsaje a nespecificky vazebná místa (NSB) se blokují 1% hovězím sérovým albuminem (BSA) v TBS pufru (50 mM Tris, 150 mM chloridu sodného, 1 mM chloridu hořečnatého a 0,02 % azidu sodného, hodnota pH 7,4) za teploty 37 °C po dobu 60 minut. Po tomto a každém z následujících kroků se deska promyje čtyřikrát puftrem (10 mM Tris, 150 mM chloridu sodného, 0,05 % Tween a 0,02 % azidu sodného, hodnota pH 7,4). Potom se přidá 50 µl hybridomového prostředí (nebo čištěného 3B9 nebo Fab fragmentů) a 50 µl zkušebního pufru (0,5 % hovězího τ-globulinu v TBS pufru) a desky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 60 minut. 100 µl biotinylované anti-myší protilátky se přidá na jamku ve zkušebním pufru a inkubuje jako je popsáno výše. Na jamku se potom přidá 100 µl alkalickou fosfatázou konjugovaného streptavidinu a inkubuje (za teploty 37 °C po dobu 30 minut). Nato se přidá 100 µl/jamka PNP substrátu a vše se inkubuje za teploty 37 °C po dobu 30 minut. Odečtení se provede při optické hustotě 405 nm.

Pro experiment 2 se desky povlečené streptavidinem (100 µl/jamka, 1 µg/ml, ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS)) inkubují za teploty 4 °C přes noc a testují, jak je popsáno dále. Roztok streptavidinu se odsaje, NSB místa se blokují 1% BSA v TBS pufru (za teploty 37 °C po dobu 60 minut). Po tomto a každém z následujících kroků se desky promyjí čtyřikrát puftrem. Potom se přidá 50 µl biotinylovaného IL4 s 50 µl zkušebního pufru a vše inkubuje za teploty 37 °C po dobu 30 minut. Potom se přidá 50 µl čištěného 3B9 IgG nebo fragmentu Fab (nebo hybridomového prostředí) a 50 µl zkušebního pufru a vše se inkubuje za teploty 37 °C po dobu 60 minut. Potom se přidá 100 µl anti-myšího IgG alkalického fosfatázového konjugátu

a inkubuje se za teploty 37 °C po dobu 60 minut. Nato se přidá 100 µl PNP substrátu a vše se inkubuje za teploty 37 °C po dobu 30 minut. Odečtení se provede jak je uvedeno výše.

B. Výpočet 3B9 afinity pro IL4

5

Za použití výsledků z experimentů popsaných výše a dále uvedeného souhrnu se vypočítá K_d pro 3B9, jak popsal Beatty a kol., J. Immunol. Methods, 100, 173–179 /1987/:

$$10 \quad K_{\text{aff}} = \frac{1}{2(2[\text{Ab}^*] - [\text{Ab}])},$$

kde

15 Ab^* znamená koncentraci Ab vázaného při 150 ng/ml biotinylovaného hIL4 a

Ab znamená koncentraci Ab vázaného při 300 ng/ml biotinylovaného hIL4.

Disociační konstanta K_d se vypočítá ze vztahu

20

$$K_d = \frac{1}{K_{\text{aff}}}.$$

25 Experiment 1: Test ELISA na streptavidinem povlečené desce s 96 jamkami (100 ng/jamka).
 $K_d = 2,2 \times 10^{-10}$ M (3B9 Fab).

Experiment 2: Test ELISA na streptavidinem povlečené desce s 96 jamkami (100 ng/jamka).
 $K_d = 1,4 \times 10^{-10}$ M (3B9 IgG).

30

C. Specificita

MAB 3B9 vede k rozpoznání lidského IL4, ale nikoli k poznání hovězího nebo myšího IL4. Jedna
cesta ke stanovení této skutečnosti se uvádí dále. ELISA se může provádět za použití desky
s 96 jamkami povlečené anti-myším IgG a následně blokování hovězím sérovým albuminem, po
kterém se s 50 µl 3B9 (100 ng/ml), 25 µl ne-lidského IL4 a 25 µl biotin-IL4 inkubuje za teploty
37 °C po dobu 60 minut, potom promytou streptavidinem konjugovanou alkalickou fosfatázou
a PNP.

35

40 Podobně bylo zjištěno, že MAB 6A1 nevede k rozeznání hovězího nebo myšího IL4.

Příklad 3

45 Humanizovaná protilátka

U jedné humanizované protilátky je v úmyslu, aby obsahovala myší CDRs v základní struktuře
humanizované protilátky. Tato humanizovaná verze IL4 specifické myší protilátky 3B9 se připra-
ví za použití dále uvedených opatření.

50

A. Způsob cDNA klonování

cDNA klony se zhotoví z 3B9 těžkých a lehkých řetězců z mRNA vyextrahované z 3B9 hybridom-
mové buněčné linie (příklad 1) za použití soupravy Boehringer Mannheim, Primery specifické

bud' pro myši pantovou oblast nebo kappa konstantní úsek se použijí pro první provazovou syntézu.

Primer s kappa řetězcem (SEQ ID č. 29):

5

5'-CTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3'

Primer s τ těžkým řetězcem (SEQ ID č. 30):

5'GTACATATGCAAGGCTTACAACCACAATC 3'

Dvouprovazová cDNA se klonuje přímo do plazmidů pGEM7f+ (Promega), které se potom transformují do E. coli DH5- α (Bethesda Research Labs).

10

B. Způsob DNA sekvencování

Myši cDNA klony s 8 těžkými řetězci a 1 lehkým řetězcem z části A uvedené výše se sekvenují. Výsledky sekvenování variabilních úseků těchto klonů jsou znázorněny v SEQ ID č. 1 a 2 a 3 a 4. Každý klon obsahující známé aminokyseliny, které se mají konzervovat mezi variabilními úseky těžkého řetězce myši a variabilními úseky lehkého řetězce myši a myšimi signálními sekvencemi. CDR aminokyselinové sekvence jsou uvedeny dále.

15

CDR úseky pro těžký řetězec jsou SEQ ID č. 22, 24 a 26 (aminokyseliny 50 až 56, 71 až 86 a 119 až 129 ze SEQ ID č. 4), viz obr. 2. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID č. 21, SEQ ID č. 23 a SEQ ID č. 25. CDR úseky pro lehký řetězec jsou SEQ ID č. 16, 18 a 20 (aminokyseliny 45 až 58, 74 až 80 a 113 až 121 ze SEQ ID č. 2), viz obr. 1. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID č. 15, 17 a 19.

20

25 C. Selektce humanizovaných základních struktur

Po klonování 3B9 se aminokyselinové sekvence variabilního úseku (aminokyseliny 21 až 132 ze SEQ ID č. 2 a aminokyseliny 20 až 140 ze SEQ ID č. 4) porovnají s lidskou imunoglobulinovou sekvencí z databáze využívající KABAT^(R) a databáze SWISS, za účelem rozpoznání lidské základní struktury jak pro těžký řetězec, tak pro lehký řetězec, které patrně byly důkladně přizpůsobeny myšimu původnímu zdroji v sekvenční homologii. Kromě těchto zjištění pro sekvenční homologii se těžké a lehké řetězce také hodnotí proti poziční databázi vyvolané ze strukturních modelů domény Fab, ke stanovení případných rozporů v důsledku aminokyselinových substitucí, které mohou ovlivnit představení CDR. Pro přítomný případ se nestanoví žádná zřejmá neshoda při hledání struktury, a proto se vyvozuje, že se použila kódující DNA z homologně zjištěné aminokyselinové sekvence.

30

35

Používají se úseky základní struktury těžkého řetězce protilátky získané z lidského myelomového imunoglobulinu (COR) (E. M. Press a N. M. Hogg, Biochem. J. 117, 641-660 /1970/). Bylo zjištěno, že tato sekvence je z přibližně 77 % homologní (69,4 % identity) k 3B9 variabilnímu úseku řetězce v úrovni aminokyseliny.

40

Pro vhodný variabilní úsek základní struktury lehkého řetězce se použije variabilní sekvence základní struktury lehkého řetězce z lidské protilátky, kterou identifikoval H. G. Klobeck a kol., Nucl. Acids Res. 13, 6515-6529 /1985/. Bylo nalezeno, že sekvence lidské protilátky je z přibližně 80,2 % homologní (72,0 % identity) k myšimu 3B9 variabilnímu úseku lehkého řetězce v úrovni aminokyseliny.

45

Dané myši 3B9 CDRs (SEQ ID č. 15 až 26) a sekvence lidské protilátky vedou k vytvoření syntetického těžkého řetězce a PCR účinkuje při doplňování a zesílení DNA. Tyto sekvence se

50

5 syntetizují následujícími překrývajícími oligonukleotidy a zesilují PCR. SEQ ID č. 31 až 37 poskytně pět překrývajících oligů a 2 PCR primery. V oligo 1 (SEQ ID č. 31) jsou zjištěny překlenovací báze 5 až 121. V oligo 2 (SEQ ID č. 32) jsou zjištěny překlenovací báze 122 až 241 a v oligo 3 (SEQ ID č. 33) jsou zjištěny překlenovací báze 242 až 361. Oba spodní pramenové primery
 5 SEQ ID č. 34 a SEQ ID č. 35 překlenují báze 134 až 110 a báze 253 až 230. Jakékoli chyby v mapované sekvenci, které byly inzerovány PCR, jsou korigovány. PCR dovoluje znovu použití jako 5' primerových nukleotidů 1 až 25 SEQ ID č. 36 a jako 3' primerových nukleotidů 361 až 341 SEQ ID č. 37.

10 Syntetický variabilní úsek se liguje do expresního vektoru pCD současně se syntetickou signální sekvencí SEQ ID č. 5 a 6 z konstrukce chimérického těžkého řetězce spolu s IgG₁ lidským konstantním úsekem. Syntetický V_H signální sekvence nukleotidu a aminokyselinové sekvence jsou uvedeny na obr. 4 (SEQ ID č. 11 a 12). Aminokyselinové sekvence CDRs (SEQ ID č. 22, 24 a 26) jsou identické s myšimi 3B9 CDRs. Avšak kódující sekvence pro tyto CDRs (SEQ ID
 15 č. 54, 55 a 56) se odlišují od myších 3B9 kódujících sekvencí (SEQ ID č. 21, 23 a 25). Výsledný expresní vektor, IL4zhcl-1-Pcd je znázorněn na obr. 9.

20 CDR genové úseky předem existující základní struktury lehkého řetězce se odstraní restrikcími fragmenty a nahradí dále uvedenými IL-4 CDR geny, které se připravily synteticky.

Pro CDR1:

SEQ ID č. 38: 5'CTAGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAAC
 TGCAAGG 3'

SEQ ID č. 39: CCTTGCAGTTGATGGTGGCCCTCTCGCCCAGAGACACAG

SEQ ID č. 40: TCGAGAGGCCTCCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAG
 TTATATGAACTGGTATCAGCAGAAACCC

SEQ ID č. 41: GGGTFTCTGCTGATACCAGTTCATATAACTATCACCATCATA
 ATCAACACTTTGGGAGGCCTC

Pro CDR2:

SEQ ID č. 44: GGGCAGCCTCCTAAGTGTCTCATTACGCTGCATCCAATCTA
 GAATCTGGGGTAC

SEQ ID č. 45: CCCAGATTCTAGATTGGATGCAGCGTAAATGAGCAACTTAGG
 AGGCTGCC

Pro CDR3:

SEQ ID č. 42: ATACTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCGAGGTTCCGG
 CGGAGGGAC

SEQ ID č. 43: CTTGGTCCCTCCGCCGAACCTCGGAGGATCCTCATTACTTTG
 CTGACAGTAGT

25 Tyto syntetické variabilní sekvence s lehkým a/nebo těžkým řetězcem se používají v konstrukci humanizované protilátky.

Příklad 4

Způsob exprese humanizovaného MAb v buňkách COS a CHO

- 5 pUC18 subklony pro V_H se připraví přidáním signálních sekvencí původně získaných z lidské protilátky SEQ ID č. 4. 5. Pro V_L se pUC18 subklony připraví přidáním signální sekvence SEQ ID č. 7.

- 10 Humanizovaný těžký řetězec, odvozený od IgG₁ izotypu, projevuje 89,3% homologii (84,3 % identity) při úrovni aminokyseliny s myším těžkým řetězcem z 3B9. Tento syntetický V_H se dostane v aminokyselinách 20 až 141 ze SEQ ID č. 11 a 12.

- 15 Humanizovaný lehký řetězec, lidský kappa řetězec, projevuje 92,0% homologii (86,6 % identity) při úrovni aminokyseliny. Tento syntetický V_L (aminokyseliny 21 až 131 ze SEQ ID č. 13 a 14) obsahující 3B9 CDRs se navrhne a syntetizuje jak je popsáno výše pro syntetické těžké řetězce.

- 20 DNA fragmenty obsahující svůj příslušný signál vázaný buď k těžkým nebo lehkým variabilním úsekům se inseruje do expresního plazmidu savčí buňky na bázi pUC19, který obsahuje CMV promotory a konstantní úseky lidského těžkého řetězce nebo lidského lehkého řetězce chiméry připravené v příkladu 5 dále, obvyklými způsoby (Maniatis a kol., cit. výše), za vzniku plazmidů IL4hzhc1-1Pcd (těžký řetězec) (obr. 9) a IL4hzlc1-o-Pcn (lehký řetězec) (obr. 10). HZHC a HZLC plazmidy se kotransfekují do buněk COS a supernatanty se zkoušejí pomocí testu ELISA, popsaného bezprostředně výše, na přítomnost humanizované protilátky po třech a po pěti dnech. Jiná humanizovaná protilátka se konstruuje s tím rozdílem, že se použije izotypu IgG4.

- 25 Výše uvedený příklad popisuje přípravu příkladné konstruované protilátky. Podobné postupy se mohou použít k vývoji jiných konstruovaných protilátek, za použití jiných anti-IL4 protilátek (například 6A1 v příkladu 7) vyvinutých běžnými prostředky.

30

Příklad 5

Způsob konstrukce chimérické protilátky

- 35 A. Chimérický těžký řetězec se konstruuje izolováním variabilního úseku myšního těžkého řetězce z původně myší MAb 3B9, jako EcoRI-BstEII restriční fragment. Malý DNA oligomer se navrhne a syntetizuje k vázání myšního variabilního úseku s humanizovaným IgG₁ konstantním úsekem (BstEII-ApaI):

- 40 5' primer: SEQ ID č. 50:

GTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGC

- 3' primer: SEQ ID č. 51:

CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACG

- 45 Tyto dva fragmenty se ligují do plazmidu pCD (viz obr. 7) (digerováno s EcoRI a ApaI), který již kóduje lidský IgG₁ konstantní úsek. Tento klon není exprimován, proto divoký typ 5'UTR a signální sekvence jsou deletovány a nahrazeny SEQ ID č. 5 a 6.

- 50 Protože obvyklá restrikce endonukleázového místa není dostupná na 3' konci signální sekvence, BstEII místo se zavede (to znamená provede se tichá mutace) přes PCR. Přitom se použijí tyto PCR primery:

SEQ ID č. 48: 5' primer:

5'CAGGTTACCCTGAAAGAGTC 3'

SEQ ID č. 49: 3' primer:

5'GAAGTAGTCCTTGACCAG 3'

- 5 Z tohoto plazmidu se potom izoluje BstEII-PstI restriční fragment. Nová signální sekvence a 5'UTR se potom navrhnu a syntetizují s EcoRI a BstEII konci.

SEQ ID č. 46: 5' primer:

AATTCGAGGACGCCAGCAACATGGTGTGCA
GACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGC
AG

- 10 SEQ ID č. 47: 3' primer:

GTAACCTGCCCGTAGGCACCAGAGATCCAGA
GCAACAGAGAAATGAAGACCTGGGTCTGCAACACCATGTTGCTGGCGTC
CTCG

- 15 Chimérický lehký řetězec se konstruuje aplikací PCR technického postupu na původní myši 3B9 lehký řetězec, který se klonuje do pGEM72f(+) (Promega). Použitými primery je komerčně dostupný pUC18 univerzální reverzní primer na konci 5' (EcoRI) a 3' primer, který zavede NarI místo

[5'CATCTAGATGGCG CCGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC3'

- 20 SEQ ID č. 52], použité k fúzi myšního variabilního úseku k lidskému konstantnímu úseku. Tento variabilní úsek se potom liguje do expresního vektoru pCDN (EcoRI NarI) (obr. 8), který již obsahuje lidský kappa úsek.

- 25 Prostředí supernatantů se zachytí o tři a pět dní později a testuje za použití ELISA tímto popsaným způsobem: Desky ELISA se povléknou 0,1 µg kozí protilátky specifické pro Fc úsek lidské protilátky. Prostředí supernatantů se přidá během 1 hodiny. Nato se přidá peroxidáza křenu seliského konjugovaná s kozí protilátkou specifickou pro celou lidskou IgG protilátku. To se provádí
30 přidáním ABTS peroxidázového substrátu (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaitersburg, MD, USA) během 1 hodiny. Stanoví se exprese chimérické protilátky. Při druhém testu ELISA se buňky COS ze supernatantů obsahující chimérické protilátky, vážou specificky k rekombinantnímu lidskému IL4 proteinu. Tento výsledek potvrzuje, že jsou klonovány geny kódující pro protilátku specificky pro IL4.

- 35 B. Humanizovaný těžký řetězec se také dostane z tohoto chimérického těžkého řetězce. Humanizovaný těžký řetězec je navržen z inserce myších CDRs do lidské základní struktury. Zvolená humanizovaná základní struktura je, jak se popisuje výše, nejhomolognější proteinová sekvence ve Švýcarské proteinové databázi, založená na myši 3B9 V_H (aminokyseliny 20 až 140 SEQ ID č. 4). Tato sekvence humanizovaného těžkého řetězce (EcoRI ApaI) se připravuje synteticky a PCR dovoluje zavést a zesílit DNA, jak je popsáno výše. Tento syntetický variabilní úsek se liguje do expresního vektoru pCD (EcoRI ApaI) dohromady se syntetickou signální sekvencí SEQ ID č. 5 a 6 z konstrukce chimérického těžkého řetězce a IgG₁ lidského konstantního úseku.

Podobně humanizovaný lehký řetězec může být odvozen od chimérického lehkého řetězce, jak je popsáno pro těžký řetězec. Tento gen (EcoR V NarI) se také připravuje synteticky. Humanizovaný V_L se liguje do expresního vektoru pCN, fragmentovaného s EcoRI NarI, spolu se signální sekvencí (EcoRI EcoV). Expresní vektor poskytuje humanizovaný kappa konstantní úsek.

Příklad 6

Způsob čištění a termodynamika – humanizovaný MAb

Čištění CHO exprimovaného chimérického a humanizovaného 3B9 se může dosáhnout běžnou proteinovou A (nebo G) afinitní chromatografií, s následující výměnou iontů a chromatografií na molekulovém síti. Podobný způsob byl úspěšně použit pro čištění jiných MABs (například na respirační syncyliární virus a malariové cirkumsporozíátové antigeny) na čistotu vyšší než 95%.

Afinita a podrobná termodynamika IL4 vázajícího se na humanizovanou MAb 3B9 a myší 3B9 (příklad 1) se stanovuje titrační mikrokolorimetrií. Tato metoda spočívá v měření vazebných reakcí na základě jejich vnitřního tepelného zabarvení reakce (viz například Wiseman a kol., Anal. Biochem. 179, 131–137 /1989/). Bylo zjištěno, že afinita obou MABs je příliš malá pro měření přímo za teploty místnosti. Tak se provádí tento termodynamický postup:

- i) afinita se měří za teploty 60 °C, která je dostatečně malá, aby byla měřena přímo, a
- ii) tepelná závislost vazebné entalpie se měří za teploty od 30 do 60 °C.

Dohromady tyto parametry dovolují vypočítat afinitu v širokém rozmezí teplot, za použití Gibbs–Helmholzovy rovnice.

Souhrn IL4 vazebných termodynamických hodnot humanizovaných a myších 3B9 protilátek je uveden v tabulce 1. Na základě změn volné energie, entalpie, entropie a tepelné kapacity dvou MABs jsou termodynamické hodnoty nerozeznatelné.

Tabulka 1

Termodynamické hodnoty hIL4 vázajícího se k humanizované 3B9 a myší 3B9 při hodnotě pH 7,4, se 150 mM chloridu sodného, za teploty 25 °C

MAb	Kd pikomol	ΔG kJ/ mol IL4	ΔH kJ/ mol IL4	$-\Delta T\Delta S$ kJ/ mol IL4	ΔC J/mol IL4/K
humanizovaný 3B9	11	-56,9±2,5	-91,2±8,4	34,3±8,8	-2428±670
myší 3B9	19	-55,7±2,5	-85,2±4,2	30,1±5,0	-2763±837

Afinity IL-4 humanizovaného 3B9 a myšího 3B9 se měří čtyřikrát a zdvojeně.

Příklad 7

Způsob výroby a charakterizace krysího MAb

MAb 6A1, zvolená pro vysokou afinitní vazebnost, je odvozena od imunizované krysy, za použití stejného postupu imunizace, jako je popsán v příkladu 1 pro myš. 6A1 je vybrán z hybridomů (jmenovitě hybridomu 3426A11C1B9), připraveného z krys imunizovaných lidským IL4.

Hodnota K_d pro 6A1 se vypočítá jak popsal Beatty a kol., v *J. Immunol. Methods* 100, 173–179 /1987/ a odpovídá 2×10^{-10} M.

5 Hybridom 3426A11C1B9 byl deponován dne 6. října 1993 v ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Public Health Laboratory Service Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Spojené království, pod depozitním číslem 93 100 620 a byl přijat jako deponovaný vzorek z důvodů patentování podle Budapešťské úmluvy z roku 1977, nařizující ukládání mikroorganismů pro účely patentového řízení.

10

Příklad 8

Biologická aktivita MAbs: 3B9 (humanizovaný), 3B9 (myší) a 6A1

15

Provedly se dále uvedené testy za použití postupů popsaných v další části.

A. Vázání glykosylovaného rhIL4

20 Výše uvedené protilátky se uvedou do styku s neglykosylovaným rekombinantním lidským IL4 (rhIL4), který je produkován v *E. coli*. Protože přirozený lidský IL4 je glykosylován, je důležité potvrdit vázání na materiál secernovaný savčí buněčnou linií. 3B9 se váže rovněž tak dobře jak ke glykosylovanému, tak k neglykosylovanému lidskému rekombinantnímu IL4 a není proto zaměřen na epitop, který by byl maskován na přirozeném lidském IL4.

25

B. Inhibice IL4 vázání na receptor

Schopnost 3B9 inhibovat vázání IL4 na svůj receptor se studuje za použití ^{125}I -rhIL4 vázaného k buněčné linii gibona, MLA (ATCC TIB201), která nese přibližně 6000 receptorů na buňku. MLA buňky se inkubují se ^{125}I -IL4 za teploty 37 °C po dobu 30 minut. Zachycení radioaktivity 30 se stanoví v τ -čítači po oddělení buněk s vázaným ^{125}I -IL4 pomocí odstředování, při použití olejového gradientu. Nеспецифické vázání se stanoví inkubací v přítomnosti stonásobného molárního přebytku neznačeného IL4 (Park a kol., *J. Exp. Med.* 166, 476–488 /1987/). Hodnota IC_{50} pro neznačený IL4 při tomto testu je 22 pM, pokud množství (přidaného) IL4 činí 83 pM. Pro intaktní myší (IgG) 3B9 hodnota IC_{50} odpovídá 63 pM a 93 pM pro fragment Fab. Při jiné koncentraci 35 IL4 (218 pM) testem stanovené množství myší (IgG) 3B9 činí 109 pM.

C. Způsob inhibice proliferace lymfocytů

40 Za použití metody, kterou popsal Spits a kol. v *J. Immunol.* 139, 1142–1147 /1987/ se periferní krevní lymfocyty člověka inkubují po dobu 3 dnů s fytohemagglutininem, T buněčným mitogenem, k regulaci IL4 receptoru. Výsledné buňky se potom dále stimulují po dobu tří dnů IL4 receptorem. Proliferace se měří inkorporací ^3H thymidinu. B buněčná proliferace se měří testem, který popsal Callard a kol. v *Lymphokines and Interferones, A Practical Approach*, kap. 19, str. 345, modifikovaným jak je popsáno dále. Čištěné lidské tonsilární B buňky se stimulují po 45 dobu 3 dnů s IL4 imobilizovaným anti-IgM. Proliferace se měří inkorporací ^3H thymidinu.

3B9 (myší) inhibuje ^3H -thymidinovou inkorporaci periferními krevními T lymfocyty člověka stimulovanými 133 pM IL4 a lidskými tonsilárními B lymfocyty stimulovanými 167 pM IL4. IL2 stimulované T lymfocyty nepůsobí. Hodnota IC_{50} pro inhibici T buněčné proliferace činí 30 pM 50 a pro B buněčnou proliferaci činí 103 pM. Odpovídající hodnoty pro Fab fragment 3B9 (myší) jsou 108 a 393 pM.

D. Způsob inhibice CD23 indukce

CD23 je nízko afinitní receptor pro IgE (FcεRII) a je indukován na membráně zbývajících B lymfocytů nízkými koncentracemi IL4 jako nezbytně nutným předpokladem pro produkci IgE. Čištěné lidské tonsilární B buňky se stimulují po dobu 2 dnů s IL4. Procento buněk exprimujících CD23 receptor se stanoví průtokovou cytometrií (Defrance a kol., J. Exp. Med. 165, 1459–1467 /1987/). 3B9 (myši) inhibuje CD23 expresi lidských tonsilárních B lymfocytů stimulovanou 8,3 pM IL4 s hodnotou IC₅₀ odpovídající 136 pM.

E. Způsob inhibice IgE sekrece

Na rozdíl od jiných testů, kde se IL4 přidává při koncentracích EC₅₀ (Pere a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 6880–6884 /1988/), IgE sekrece se zjišťuje v přítomnosti IL4 v koncentracích poskytujících maximální sekreci, za účelem snížení inherentní variability v tomto systému. T buňková proliferace se stanoví jak je uvedeno dále. Periferní krevní lymfocyty člověka se inkubují s IL4 po dobu mezi 10 a 18 dny, výhodně 12 dnů. Koncentrace IgE v supernatantu kultury se stanoví pomocí ELISA.

IgE sekrece se inhibuje 3B9 (myši) a Fab fragmentem 3B9 v přítomnosti 1,7 nM IL4, co poskytnou hodnoty IC₅₀ odpovídající 1,9 a 5,0 nM. Experiment se opakuje za použití nižší koncentrace IL4, která činí 667 pM, co snižuje hodnotu IC₅₀ na 0,65 nM pro 3B9 (myši). Molární poměr protilátky (IgG) k IL4 zůstává nezměněn (1:1) ve zkoušených koncentračních mezích.

F. Shrnutí a interpretace hodnot

Molární poměry IL4 k různým MAbs, vyžadované pro 50% inhibici funkce při biologických testech, jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Komparativní aktivity MAbs 3B9, 6A1 a humanizovaného 3B9 (varianty IgG₁ a IgG₄) při biologických testech závislých na IL4

Test	IC ₅₀ (pM) (rozmezí) _n			
	Myši 3B9	Myši 3B9 (Fab)	Krysí 6A1	Humanizovaný 3B9 IgG1 IgG4*
RBA	63 (17–109) ₂	93	>50 000	
T buňka	30 (10–40) ₄	108	87	44 (30–56) ₃ 40
B buňka	103 (79–120) ₃	393	187	47 (10–80) ₃ 79
CD23 indukce	136 (53–272) ₄	216	80	333
IgE syntéza	658 (370–1070) ₆	1170	623 (412–833) ₂	54 (35–83) ₃ 406

n = počet provedených oddělených testů

* IgG₁ a IgG₄ varianty se testují v odlišnou dobu

Při všech testech, s výjimkou sekrece IgE, se IL4 přidává v koncentraci přibližně ED₅₀. Molární poměry protilátky k IL4 vyžadované pro 50% inhibici jsou podobné pro lidský 3B9, myši 3B9 a 6A1 ve dvou testech proliferace lymfocytů, ale vyšší pro humanizovaný 3B9 při testu indukce CD23, co je zvláště citlivý test zřejmě vyžadující velmi nízkou náplň receptoru (přibližně 5 %)

(Kruse a kol., EMBO J. 12, 5121 /1993/), a jak je zřejmé z výsledků dosažených s myší 3B9, působí vnitřní změnu testu.

5 Porovnání aktivit krysí 6A1 a myší 3B9 dokládá podobný profil funkčních účinností, ale neočekávané selhání 6A1 při plné inhibici vázání radioaktivně jodovaného IL4 na své receptory. Za radioaktivně jodovaný IL4 používaný při testu vázání receptoru se má považovat jodovaný tyrosin přístupný na zbytku 124. Pokud se porovná schopnost 6A1 inhibovat expresi CD23 indukovanou buď neznačeným nebo jodovaným IL4, zjistí se, že inhibice je méně účinná oproti jodovanému ligandu. Tyto výsledky ukazují, že 6A1 se váže k IL4 v úseku tyrosinu 124, ale toto vázání není
10 specifické.

Tak poslední hodnoty ukazují, že 6A1 je neutralizující protilátka o vysoké afinitě, vázající se k velmi odlišným úsekům IL4 spíše než 3B9.

15

Příklad 9

Farmakokinetické údaje

20 Farmakokinetika humanizované 3B9 se stanovuje u samčích krych kmene Sprague Dawley. Humanizovaná 3B9 se podává čtyřem zvířatům jako i.v. bolus v dávce 1 mg/kg, přičemž ve vzorkování krve se pokračuje po dobu 5 týdnů po dávce. Koncentrace humanizované 3B9 v plazmě se stanovuje za použití IL4/anti-lidského IgG sendviče ELISA určeného k potvrzení nejen přítomnosti cirkulujícího lidského IgG, ale také schopnosti vázat se k rekombinantnímu lidskému IL4.

25

Výsledky z této studie jsou shrnuty do tabulky 3.

Tabulka 3

30

Farmakokinetika humanizované 3B9 v samčích krysách kmene Sprague-Dawley (dávka 1 mg/kg, i.v. bolus)

	CLP (ml/h/kg)
krysa 1	0,442
krysa 2	0,655
krysa 3	0,555
krysa 4	0,447
průměr	0,525
směrodatná odchylka	0,101

35 Zkratka farmakokinetického parametru:

Clp znamená zdánlivá clearance plazmy

40 Údaje ukazují, že interanimální variabilita je relativně malá a vymizení humanizované 3B9 z plazmy se zdá být dvojfázové. Zdánlivá clearance plazmy je nízká (0,5 ml/h/kg). Poločas života se zdá být 11 dnů. Tak farmakokinetické charakteristiky humanizované 3B9 odvozené od CHO buněk jsou konzistentní s jinými humanizovanými monoklonálními protilátkami u krych. Dlouhý poločas života humanizované 3B9 u krysy při cirkulaci také naznačuje, že když se podává humanizovaná 3B9 člověku, je pravděpodobně účinná během prodlouženého časového období.

45

Do výše uvedeného popisu je zahrnuta řada modifikací a variací a očekává se, že budou zřejmé odborníkovi v oboru. Například úseky lidské základní struktury nebo jejich modifikace, jiné než jsou výše popsány příklady protilátek, se mohou použít při konstrukci humanizovaných protilá-

tek. Takové modifikace a změny prostředků a způsobů podle tohoto vynálezu se pokládají za zahrnuté do rozsahu připojených patentových nároků.

5 Seznam sekvencí

1) Obecné informace

10 i) Přihlašovatel:

Stephen D. Holmes,
Mitchell S. Gross,
Daniel R. Sylvester

15

ii) Název vynálezu: Rekombinantní IL4 protilátky použitelné pro ošetřování chorob zprostředkovaných IL4

iii) Počet sekvencí: 58

20

iv) Adresa pro korespondenci:

a) Adresát: SmithKline Beechem Corporation

b) Ulice: Corporate Intellectual Property,
UW2220 – 709 Swedeland Rd.

25

c) Město: King of Purssia

d) Stát: PA

e) Země: USA

f) PSČ (ZIP): 19406–2799

30

v) Počítačová čtecí forma:

a) Typ média: Floppy disk

b) Počítač: IBM PC kompatibilní

35

c) Operační systém: PC–DOS/MS–DOS

d) Software: PatentIn Release # 1.0,
Verze # 1,25

vi) Prioritní údaje přihlášky:

40

a) Číslo přihlášky: US 08/117 366

b) Datum podání: 7. září 1993

c) Zatřídění:

45

a) Číslo přihlášky: US 08/136 783

b) Datum podání: 14. října 1993

c) Zatřídění:

viii) Informace o zástupci:

50

a) Jméno: Jeffrey A. Sutton

b) Registrační číslo: 34 028

c) Číslo spisu: P50186–2

ix) Telekomunikační informace:

- 5 a) Telefon: (215)270 50 24
b) Telefax: (215)270 50 90

2) Informace pro SEQ ID č. 1:

10 i) Charakteristiky sekvence:

- 15 a) Délka: 396 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

20 ix) Rysy:

- a) Jméno/klíč: CDS
b) Lokace: 1..396

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 1:

ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA	48
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	
GGC TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala	
20 25 30	
GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT	144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA	192
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
50 55 60	
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT	240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
65 70 75 80	
GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC	288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT	336
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	
100 105 110	
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG	384
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
115 120 125	
GAA ATC AAA CGG	396
Glu Ile Lys Arg	
130	

2) Informace pro SEQ ID č. 2:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 132 aminokyselin
 b) Typ: aminokyseliny
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

10

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 2:

```

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
  1           5           10           15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
          20           25           30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          35           40           45
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
          50           55           60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
          65           70           75           80
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85           90           95
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
          115          120          125
Glu Ile Lys Arg
          130

```

2) Informace pro SEQ ID č. 3:

15

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 483 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

a) Jméno/klíč: CDS

b) Lokace: 64..483

5

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 3:

GAATTCGCGG CCGCTATGCA GGGCAATCA GCAGCAGCAA TGAGGAAGTA AGCCTGTGCA	60
GAT ATG AAC AGG CTT ACT TCC TCA TTG CTG CTG CTG ATT GTC CCT GCA	108
Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala	
1 5 10 15	
TAT GTC CTG TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG	156
Tyr Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu	
20 25 30	
CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA	204
Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser	
35 40 45	
CTG AGC ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG CCT TCA GGA	252
Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly	
50 55 60	
AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC	300
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg	
65 70 75	
TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC TCC	348
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser	
80 85 90 95	
AGC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT	396
Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr	
100 105 110	
GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC	444
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe	
115 120 125	
GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	483
Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

2) Informace pro SEQ ID č. 4:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 140 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

10

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 4:

```

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
  1                   5                   10                   15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
                   20                   25                   30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
                   35                   40                   45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
                   50                   55                   60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                   65                   70                   75                   80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
                   85                   90                   95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
                   100                  105                  110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp
                   115                  120                  125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                   130                  135                  140

```

2) Informace pro SEQ ID č. 5:

15

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 60 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojité
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 5 a) Jméno/klíč: CDS
b) Lokace: 1..60

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 5:

ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TIG CTC TGG ATC TCT	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
GGT GCC TAC GGG	60
Gly Ala Tyr Gly	
20	

10

2) Informace pro SEQ ID č. 6:

i) Charakteristiky sekvence:

- 15 a) Délka: 20 aminokyselin
b) Typ: aminokyselina
d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

20

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 6:

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
Gly Ala Tyr Gly	
20	

2) Informace pro SEQ ID č. 7:

25

i) Charakteristiky sekvence:

- 30 a) Délka: 57 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

35

ix) Rysy:

- a) Jméno/klíč: CDS
b) Lokace: 1..57

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 7:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
GTC CAC TCC	57
Val His Ser	

5 2) Informace pro SEQ ID č. 8:

i) Charakteristiky sekvence:

10 a) Délka: 19 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

15 xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 8:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
Val His Ser	

2) Informace pro SEQ ID č. 9:

20 i) Charakteristiky sekvence:

25 a) Délka: 423 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

5

a) Jméno/klíč: CDS

b) Lokace: 1..423

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 9:

ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TTG CTC TGG ATC TCT	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG	96
Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu	
20 25 30	
CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA	144
Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser	
35 40 45	
CTG AGC ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG CCT TCA GGA	192
Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly	
50 55 60	
AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC	240
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg	
65 70 75 80	
TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC TCC	288
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser	
85 90 95	
AGC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT	336
Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr	
100 105 110	
GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC	384
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe	
115 120 125	
GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	423
Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

10

2) Informace pro SEQ ID č. 10:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 141 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

10

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 10:

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
  1                    5                10                15

Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu
                20                25                30

Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser
                35                40                45

Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly
  50                    55                60

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
  65                    70                75                80

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
                85                90                95

Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr
                100                105                110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe
  115                120                125

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
  130                135                140

```

2) Informace pro SEQ ID č. 11:

15

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 423 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

2) Informace pro SEQ ID č. 12:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 141 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 12:

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
  1                               5           10           15

Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val
                20                   25                   30

Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser
          35                   40                   45

Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
          50                   55                   60

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
          65                   70                   75                   80

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
                85                   90                   95

Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr
          100                   105                   110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe
          115                   120                   125

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
          130                   135                   140

```

2) Informace pro SEQ ID č. 13:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 393 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

10 ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 15 a) Jméno/klíč: CDS
 b) Lokace: 1..393

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 13:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
GTC CAC TCC GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCG CTA GCT GTG	96
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val	
20 25 30	
TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG GCC TCC CAA AGT GTT	144
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val	
35 40 45	
GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG	192
Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
50 55 60	
CAG CCT CCT AAG TTG CTC ATT TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG	240
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly	
65 70 75 80	
GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC	288
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu	
85 90 95	
ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTA TAC TAC TGT CAG	336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln	
100 105 110	
CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG	384
Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu	
115 120 125	
ATC AAA CGT	393
Ile Lys Arg	
130	

2) Informace pro SEQ ID č. 14:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 131 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 14:

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
           20           25           30

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
           35           40           45

Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
           50           55           60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
           65           70           75           80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
           85           90           95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
           100           105           110

Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
           115           120           125

Ile Lys Arg
           130

```

2) Informace pro SEQ ID č. 15:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 45 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

10 ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 15 a) Jméno/klíč: CDS
 b) Lokace: 1..45

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 15:

```

AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC      45
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
  1                5                10                15

```

20 2) Informace pro SEQ ID č. 16:

i) Charakteristiky sekvence:

- 25 a) Délka: 15 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

30 xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 16:

```

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
  1                5                10                15

```

2) Informace pro SEQ ID č. 17:

35 i) Charakteristiky sekvence:

- 40 a) Délka: 21 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 45 a) Jméno/klíč: CDS
 b) Lokace: 1..21

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 17:

GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

21

2) Informace pro SEQ ID č. 18:

5

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 7 aminokyselin
b) Typ: aminokyselina
d) Topologie: lineární

10

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 18:

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

15

2) Informace pro SEQ ID č. 19:

i) Charakteristiky sekvence:

20

- a) Délka: 27 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

25

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

30

- a) Jméno/klíč: CDS
b) Lokace: 1..27

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 19:

CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

27

35

2) Informace pro SEQ ID č. 20:

i) Charakteristiky sekvence:

40

- a) Délka: 9 aminokyselin
b) Typ: aminokyselina
d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 20:

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

5 2) Informace pro SEQ ID č. 21:

i) Charakteristiky sekvence:

- 10 a) Délka: 21 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

15 ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 20 a) Jméno/klíč: CDS
b) Lokace: 1..21

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 21:

ACT TCT GGT ATG GGT GTG AGC
Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
1 5

21

25 2) Informace pro SEQ ID č. 22:

i) Charakteristiky sekvence:

- 30 a) Délka: 7 aminokyselin
b) Typ: aminokyselina
d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 22:

35 Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
1 5

2) Informace pro SEQ ID č. 23:

40 i) Charakteristiky sekvence:

- 45 a) Délka: 48 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

5

a) Jméno/klíč: CDS

b) Lokace: 1..48

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 23:

```

CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC      48
His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
  1             5             10             15

```

10

2) Informace pro SEQ ID č. 24:

i) Charakteristiky sekvence:

15

a) Délka: 16 aminokyselin

b) Typ: aminokyselina

d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

20

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 24:

```

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
  1             5             10             15

```

2) Informace pro SEQ ID č. 25:

25

i) Charakteristiky sekvence:

a) Délka: 33 párů bází

b) Typ: nukleová kyselina

30

c) Řetězec: dvojitý

d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

35

ix) Rysy:

a) Jméno/klíč: CDS

b) Lokace: 1..33

40

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 25:

```

AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC      33
Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
  1             5             10

```

2) Informace pro SEQ ID č. 26:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 11 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 26:

Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

2) Informace pro SEQ ID č. 27:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 27 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- a) Jméno/klíč: CDS
 b) Lokace: 1..27

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 27:

CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg
 1 5 27

2) Informace pro SEQ ID č. 28:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 9 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 28:

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Arg
 1 5

2) Informace pro SEQ ID č. 29:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 36 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 29:

CTAACACTCA TTCCTGTTGA AGCTCTTGAC AATGGG

36

2) Informace pro SEQ ID č. 30:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 29 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 30:

GTACATATGC AAGGCTTACA ACCACAATC

29

2) Informace pro SEQ ID č. 31:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 117 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 31:

GGTTACCCSTG CGTGAATCCG GTCCGGCACT AGTTAAACCG ACCCAGACCC TGACGTTAAC

60

CTGCACCTTC TCCGGTTTCT CCCGTGCGAC CTCCGGTATG GGTGTTTCCT GGATCCG

117

2) Informace pro SEQ ID č. 32:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5
 a) Délka: 120 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 32:

TCAGCCGCGG GGTAAAGGTC TAGAATGGCT GGCTCACATC TACTGGGACG ACGACAAACG 60

TTACAACCCG AGCCTGAAAT CCCGTCTGAC GATATCCAAA GACACCTCCC GTAACCAGGT 120

2) Informace pro SEQ ID č. 33:

i) Charakteristiky sekvence:

- 20
 a) Délka: 120 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 33:

TGTTCTGACC ATGGACCCCG TTGACACCGC TACCTACTAC TGCCTCGTC GCGAAACCGT 60

TTTCTACTGS TACTTCGACG TTTGGGGTCG TGSTACCCCA GTTACCGTGA GCTCCCAACC 120

2) Informace pro SEQ ID č. 34:

i) Charakteristiky sekvence:

- 35
 a) Délka: 25 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 34:

ACCCGGCGGC TGACGGATCC AGGAA 25

2) Informace pro SEQ ID č. 35:

- 5 i) Charakteristiky sekvence:
- a) Délka: 24 párů bází
 - b) Typ: nukleová kyselina
 - c) Řetězec: jediný
 - d) Topologie: neznámá
- 10 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
- xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 35:
- ATGGTCAGAA CAACCTGGTT ACGG**
- 24
- 15 2) Informace pro SEQ ID č. 36:
- i) Charakteristiky sekvence:
- a) Délka: 25 párů bází
 - b) Typ: nukleová kyselina
 - c) Řetězec: jediný
 - d) Topologie: neznámá
- 20 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
- 25 xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 36:
- TTCGGTTAC CCTGCGTGAA TCCGG**
- 25
- 30 2) Informace pro SEQ ID č. 37:
- i) Charakteristiky sekvence:
- a) Délka: 21 párů bází
 - b) Typ: nukleová kyselina
 - c) Řetězec: jediný
 - d) Topologie: neznámá
- 35 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
- xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 37:
- CCAACCCCTCG AGTGCCATTG A**
- 21
- 40 2) Informace pro SEQ ID č. 38:
- i) Charakteristiky sekvence:
- a) Délka: 43 párů bází
 - b) Typ: nukleová kyselina
 - c) Řetězec: jediný
 - d) Topologie: neznámá
- 45

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 38:

5 CTAGCTGTGT CTCTGGGGGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGG

43

2) Informace pro SEQ ID č. 39:

i) Charakteristiky sekvence:

10

- a) Délka: 39 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

15

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 39:

CCTTGCAGTT GATGGTGGCC CTCTGCCCA GAGACACAG

39

20

2) Informace pro SEQ ID č. 40:

i) Charakteristiky sekvence:

25

- a) Délka: 67 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

30

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 40:

TCGAGAGGCC TCCCAAAGTG TTGATTATGA TGGTGATAGT TATATGAACT GGTATCAGCA

60

GAAACCC

67

35 2) Informace pro SEQ ID č. 41:

i) Charakteristiky sekvence:

40

- a) Délka: 63 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

45

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 41:

GGGTTTCTGC TGATACCAGT TCATATAACT ATCACCATCA TAATCAACAC TTTGGGAGGC 60

CTC 63

2) Informace pro SEQ ID č. 42:

5 i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 51 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 10 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 42:

15 ATACTACTGT CAGCAAAGTA ATGAGGATCC TCCGAGGTTT GGCGGAGGGA C 51

2) Informace pro SEQ ID č. 43:

20 i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 53 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 25 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 43:

30 CTTGGTCCCT CCGCCGAACC TCGGAGGATC CTCATTACTT TGCTGACAGT AGT 53

2) Informace pro SEQ ID č. 44:

35 i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 55 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

40 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 44:

GGGCAGCCCTC CTAAGITGCT CATTACGCT GCATCCAATC TAGAATCTGG GGTAC 55

2) Informace pro SEQ ID č. 45:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 51 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

10 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 45:

CCCAGATTCT AGATTGGATG CAGCGTAAAT GAGCRACTTA GGAGGCTGCC C

51

15 2) Informace pro SEQ ID č. 46:

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 83 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

25 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 46:

AATTCGAGGA CGCCAGCAAC ATGGTGTTC AGACCCAGGT CTCATTCTCT CTGTTGCTCT

60

GGATCTCTGG TGCCTACGGG CAG

83

30 2) Informace pro SEQ ID č. 47:

i) Charakteristiky sekvence:

- 35 a) Délka: 84 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

40 xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 47:

GTAACCTGCC CGTAGGCACC AGAGATCCAG AGCAACAGAG AAATGAAGAC CTGGGTCTGC

60

AACACCATGT TGCTGGCGTC CTCG

84

2) Informace pro SEQ ID č. 48:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 20 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

10 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 48:

CAGGTTACCC TGAAAGAGTC

20

15 2) Informace pro SEQ ID č. 49:

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 18 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

25 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 49:

GAAGTAGTCC TTGACCAG

18

2) Informace pro SEQ ID č. 50:

30

i) Charakteristiky sekvence:

- 35 a) Délka: 31 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: jediný
 d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

40 xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 50:

GTCACCGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGG C

31

2) Informace pro SEQ ID č. 51:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 22 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: jediný
d) Topologie: neznámá

10 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 51:

CTTGGTGCTA GCTGAGGAGA CG

22

15 2) Informace pro SEQ ID č. 52:

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 47 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: jediný
d) Topologie: neznámá

25 ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 52:

CATCTAGATG GCGCCGCCAC AGTACGTTTG ATCTCCAGCT TGGTCCC

47

30 2) Informace pro SEQ ID č. 53:

i) Charakteristiky sekvence:

- 35 a) Délka: 45 párů bází
b) Typ: nukleová kyselina
c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

40 xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 53:

AAGGCCTCCC AAAGTGTGA TTATGATGGT GATAGTTATA TGAAC

45

2) Informace pro SEQ ID č. 54:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 21 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

10 ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 54:

ACCTCCGGTA TGGGTGTTTC C

21

15 2) Informace pro SEQ ID č. 55:

i) Charakteristiky sekvence:

- 20 a) Délka: 48 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

25 ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 55:

CACATCTACT GGGACGACGA CAAACGTTAC AACCCGAGCC TGAAATCC

48

30 2) Informace pro SEQ ID č. 56:

i) Charakteristiky sekvence:

- 35 a) Délka: 33 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina
 c) Řetězec: dvojitý
 d) Topologie: neznámá

40 ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 56:

CGCGAAACCG TTTTCTACTG GTACTTCGAC GTT

33

2) Informace pro SEQ ID č. 57:

45 i) Charakteristiky sekvence:

- 50 a) Délka: 393 párů bází
 b) Typ: nukleová kyselina

- c) Řetězec: dvojitý
d) Topologie: neznámá

5 ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 10 a) Jméno/klíč: CDS
b) Lokace: 1..393

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 57:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
GTC CAC TCC GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCG CTA GCT GTG	96
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val	
20 25 30	
TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG GCC TCC CAA AGT GTT	144
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val	
35 40 45	
GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG	192
Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
50 55 60	
CAG CCT CCT AAG TTG CTC ATT TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG	240
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly	
65 70 75 80	
GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC	288
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu	
85 90 95	
ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTA TAC TAC TGT CAG	336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln	
100 105 110	
CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAA GTG GAG	384
Gln Ser Asn Gln Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu	
115 120 125	
ATC AAA CGT	393
Ile Lys Arg	
130	

2) Informace pro SEQ ID č. 58:

i) Charakteristiky sekvence:

- 5 a) Délka: 131 aminokyselin
 b) Typ: aminokyselina
 d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

10

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 58:

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1                               5                               10                               15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
                               20                               25                               30
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
  35                               40                               45
Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
  50                               55                               60
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
  65                               70                               75                               80
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                               85                               90                               95
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
  100                              105                              110
Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
  115                              120                              125
Ile Lys Arg
  130

```

15

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Fúzní protein s vazebnou specificitou pro lidský interleukinu-4 (IL4), který zahrnuje oblasti determinující komplementaritu těžkého řetězce (CDRs), které mají aminokyselinovou sekvenci znázorněnou v SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24 nebo SEQ ID č. 26 a oblasti determinující komplementaritu lehkého řetězce (CDRs), které mají aminokyselinovou sekvenci znázorněnou v SEQ ID č. 16, SEQ ID č. 18, SEQ ID č. 20 nebo SEQ ID č. 28.
- 10 2. Fúzní protein podle nároku 1, který zahrnuje aminokyselinovou sekvenci variabilní oblasti těžkého řetězce znázorněnou v SEQ ID č. 12 a aminokyselinovou sekvenci variabilní oblasti lehkého řetězce znázorněnou v SEQ ID č. 14.
- 15 3. Oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového těžkého řetězce, jejíž aminokyselinová sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z
- a) ThrSerGlyMetGlyValSer: SEQ ID č. 22,
- 20 b) HisIleTyrTrpAspAspAspLysArgTyrAsnProSerLeuLysSer: SEQ ID č. 24 a
- c) ArgGluThrValPheTyrTrpPheAspVal: SEQ ID č. 26.
- 25 4. Oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového lehkého řetězce, jejíž aminokyselinová sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z
- a) LeuAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsn: SEQ ID č. 16,
- b) AlaAlaSerAsnLeuGluSer: SEQ ID č. 18,
- 30 c) GlnGlnSerAsnGluAspProProArg: SEQ ID č. 28 a
- d) GlnGlnSerAsnGluAspProProThr: SEQ ID č. 20.
- 35 5. Molekula nukleové kyseliny kódující oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového těžkého řetězce, jejíž sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z
- a) ACT TCT GGT ATG GGT GTG GTG AGC: SEQ ID č. 21,
- 40 b) CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC: SEQ ID č. 23,
- c) AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC: SEQ ID č. 25,
- d) ACC TCC GGT ATG GGT GTT TCC: SEQ ID č. 54,
- 45 e) CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC AAA CGT TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC: SEQ ID č. 55 a
- 50 f) CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC GAC GTT: SEQ ID č. 56.

6. Molekula nukleové kyseliny kódující oblast determinující komplementaritu (CDR) imunoglobulinového lehkého řetězce, jejíž sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z
- 5 a) AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG ACC: SEQ ID č. 15,
- b) AAG GCC TCC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC: SEQ ID č. 53,
- 10 c) GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT: SEQ ID č. 17,
- d) CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG: SEQ ID č. 19 a
- 15 e) CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG: SEQ ID č. 27.
7. Humanizovaná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec podle nároku 1, kde tato protilátka je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4, přičemž úseky základní struktury uvedeného těžkého řetězce a uvedeného lehkého řetězce jsou odvozeny od alespoň jedné zvolené lidské protilátky a aminokyselinové sekvence oblasti determinující komplementaritu každého z těchto řetězců jsou odvozené od nelidské neutralizující monoklonální protilátky specifické pro lidský IL4, která je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4.
- 20 8. Protilátka podle nároku 7, která je účinně vázána k efektorovému prostředku zvolenému ze souboru sestávajícího z molekuly neproteinové nosné látky, polystyrenu a plastových kuliček.
- 25 9. Chimérická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec podle nároku 1, která je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4, přičemž aminokyselinové sekvence oblasti determinující komplementaritu každého řetězce jsou odvozené od nelidské neutralizující monoklonální protilátky specifické pro lidský IL4, která je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4.
- 30 10. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje fúzní protein podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelnou nosnou látku.
- 35 11. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je zvolena ze souboru sestávajícího ze
- 40 a) sekvence nukleové kyseliny kódující fúzní protein mající aminokyselinovou sekvenci znázorněnou v SEQ ID č. 14 nebo SEQ ID č. 12,
- b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k a),
- 45 c) sekvence nukleové kyseliny z 18 nebo více nukleotidů schopných hybridizace s a) nebo b) za přísných podmínek a
- d) fragmentu nebo analogu a), b) nebo c), který kóduje protein charakterizovaný specificitou pro lidský interleukin-4,
- 50 přičemž tato sekvence popřípadě obsahuje restriční místo.

12. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je zvolena ze souboru sestávajícího ze
- a) sekvence nukleové kyseliny kódující komplementaritu determinizující oblast (CDR), která má aminokyselinovou sekvenci vybranou ze souboru zahrnujícího SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24, SEQ ID č. 26, SEQ ID č. 16, SEQ ID č. 18, SEQ ID č. 20 nebo SEQ ID č. 28,
 - b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k a),
 - c) sekvence nukleové kyseliny z 18 nebo více nukleotidů schopných hybridizace s a) nebo b) za přísných podmínek a
 - d) fragmentu nebo analogu a), b) nebo c), který kóduje protein charakterizovaný specificitou pro lidský interleukin-4.
13. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 12, kde sekvence je vybrána ze souboru sekvencí kódujících oblast determinující komplementaritu těžkého řetězce, sestávajících z
- a) ACT TCT GGT ATG GGT GTG GTG AGC: SEQ ID č. 21,
 - b) CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC: SEQ ID č. 23,
 - c) AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC: SEQ ID č. 25,
 - d) ACC TCC GGT ATG GGT GTT TCC: SEQ ID č. 54,
 - e) CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC AAA CGT TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC: SEQ ID č. 55 a
 - f) CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC GAC GTT: SEQ ID č. 56.
14. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 12, kde sekvence je vybrána ze souboru sekvencí kódujících oblast determinující komplementaritu lehkého řetězce, sestávajících z
- a) AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG ACC: SEQ ID č. 15,
 - b) AAG GCC TCC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC: SEQ ID č. 53,
 - c) GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT: SEQ ID č. 17,
 - d) CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG: SEQ ID č. 19 a
 - e) CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG AGG: SEQ ID č. 27.
15. Rekombinantní plazmid, který zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 11.
16. Rekombinantní plazmid, který zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 12.
17. Hostitelská buňka, která je transfekována rekombinantním plazmidem podle nároku 15.
18. Hostitelská buňka, která je transfekována rekombinantním plazmidem podle nároku 16.

19. Způsob přípravy humanizované protilátky specifické pro lidský interleukin-4, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že zahrnuje kultivaci buněčné linie transfekované rekombinantním plazmidem podle nároku 15 za řízení vybraných regulačních sekvencí schopných řídit expresi v těchto buňkách.

5

20. Způsob diagnózy alergií a jiných stavů spojených s nadměrnou produkcí imunoglobulinu E u člověka, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se vzorek biologické kapaliny uvede do styku s monoklonální protilátkou podle nároku 1 proti lidskému IL4 s disociační konstantou nižší než $2,0 \times 10^{-10}$ M, která má vysoký titr pro lidský interleukin-4, a stanoví se výskyt vazby mezi uvedenou monoklonální protilátkou a lidským interleukinem-4.

10

21. Způsob vyšetření monoklonálních protilátek podle nároku 1 proti lidskému IL4 s disociační konstantou nižší než $2,0 \times 10^{-10}$ M, které mají vysoký titr pro lidský interleukin-4, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že se

15

a) připraví hybridom buněčné linie charakterizované sekrecí monoklonální protilátky proti lidskému interleukinu-4 a

b) tato hybridomová buněčná linie vyšetří aldehydem kondenzovaným na lidský interleukin-4 nebo s biotinylovaným lidským interleukinem-4.

20

25

11 výkresů

Obr. 1

Myší protilátka 3B9 s lehkým řetězcem
Přirozená *signální sekvence* a variabilní úsek

Nukleotidová sekvence SEQ ID č. 1

Aminokyselinová sekvence SEQ ID č. 2

ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC	39
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu	
1 5 10	
TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA	78
Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln	
15 20 25	
TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC	117
Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala	
30 35	
ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT	156
Thr Ile Ser Cys <u>Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp</u>	
40 45 50	
GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA	195
<u>Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly</u>	
55 60 65	
CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA	234
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr <u>Ala Ala Ser Asn Leu</u>	
70 75	
GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT	273
<u>Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser</u>	
80 85 90	
GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG	312
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu	
95 100	
GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG	351
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys <u>Gln Gln Ser Asn Glu</u>	
105 110 115	
GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC	390
<u>Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile</u>	
120 125 130	
AAA CGG	396
Lys Arg	

Obr. 2 - pokračování

TAC	TGG	TAC	TTC	GAT	GTC	TGG	GGC	GCA	GGG	ACC	ACG	GTC	471
<u>TYR</u>	<u>TRP</u>	<u>TYR</u>	<u>PHE</u>	<u>ASP</u>	<u>VAL</u>	TRP	GLY	ALA	GLY	THR	THR	VAL	
	125					130						135	
ACC	GTC	TCC	TCA										483
Thr	Val	Ser	Ser										
			140										

Obr. 3

Lidská/myší 3B9 chimérní protilátka s těžkým řetězcem
Signální sekvence a variabilní úsek

Nukleotidová sekvence SEQ ID č. 9
Aminokyselinová sekvence SEQ ID č. 10

ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TTG CTC	39
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu	
1 5 10	
TGG ATC TCT GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG AAA GAG	78
Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu	
15 20 25	
TCT GGC CCT GGG ATA TTG CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT	117
Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser	
30 35	
CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA CTG AGC ACT TCT	156
Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	
40 45 50	
GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG CCT TCA GGA AAG	195
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys	
55 60 65	
GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAT GAC	234
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp	
70 75	
AAG CGC TAT AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC	273
Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile	
80 85 90	
TCC AAG GAT ACC TCC AGC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC	312
Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile	
95 100	
ACC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT GCC ACA TAC TAC TGT	351
Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
105 110 115	
GCT CGA AGA GAG ACT GTG TTC TAC TGG TAC TTC GAT GTC	390
Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val	
120 125 130	
TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	423
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
135 140	

Obr. 4

Humanizovaná 3B9 protilátka s těžkým řetězcem
Signální sekvence a variabilní úsek

Nukleotidová sekvence SEQ ID č. 11

Aminokyselinová sekvence SEQ ID č. 12

ATG GTC TTG CAG ACC CAG GTC TTC ATT TCT CTG TTG CTC	39
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu	
1 5 10	
TGG ATC TCT GGT GCC TAC GGG CAG GTT ACC CTG CGT GAA	78
Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu	
15 20 25	
TCC GGT CCG GCA CTA GTT AAA CCG ACC CAG ACC CTG ACG	117
Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr	
30 35	
TTA ACC TGC ACC TTC TCC GGT TTC TCC CTG TCG ACC TCC	156
Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	
40 45 50	
GGT ATG GGT GTT TCC TGG ATC CGT CAG CCG CCG GGT AAA	195
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
55 60 65	
GGT CTA GAA TGG CTG GCT CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC	234
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp	
70 75	
AAA CGT TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC CGT CTG ACG ATA	273
Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile	
80 85 90	
TCC AAA GAC ACC TCC CGT AAC CAG GTT GTT CTG ACC ATG	312
Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met	
95 100	
ACT AAC ATG GAC CCG GTT GAC ACC GCT ACC TAC TAC TGC	351
Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
105 110 115	
GCT CGA CGC GAA ACC GTT TTC TAC TGG TAC TTC GAC GTT	390
Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val	
120 125 130	
TGG GGT CGT GGT ACC CCA GTT ACC GTG AGC TCA	423
Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser	
135 140	

Obr. 5

Humanizovaná 3B9 protilátka s lehkým řetězcem
Signální sekvence a variabilní úsek

Nukleotidová sekvence SEQ ID č. 13
 Aminokyselinová sekvence SEQ ID č. 14

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA	39
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr	
1 5 10	
GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT	78
Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser	
15 20 25	
CCA GAC TCG CTA GCT GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC	117
Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr	
30 35	
ATC AAC TGC AAG GCC TCC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT	156
Ile Asn Cys <u>Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly</u>	
40 45 50	
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG CAG	195
<u>Asp Ser Tyr Met Asn</u> Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
55 60 65	
CCT CCT AAG TTG CTC ATT TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA	234
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr <u>Ala Ala Ser Asn Leu Glu</u>	
70 75	
TCT GGG GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG	273
<u>Ser</u> Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
80 85 90	
ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA	312
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu	
95 100	
GAT GTG GCA GTA TAC TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT	351
Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys <u>Gln Gln Ser Asn Glu Asp</u>	
105 110 115	
CCT CCG AGG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA	390
<u>Pro Pro Arg</u> Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
120 125 130	
CGT	393
Arg	

Obr. 6A

Signální sekvence
 Nukleotid SEQ ID č. 5
 Aminokyselina SEQ ID č. 6

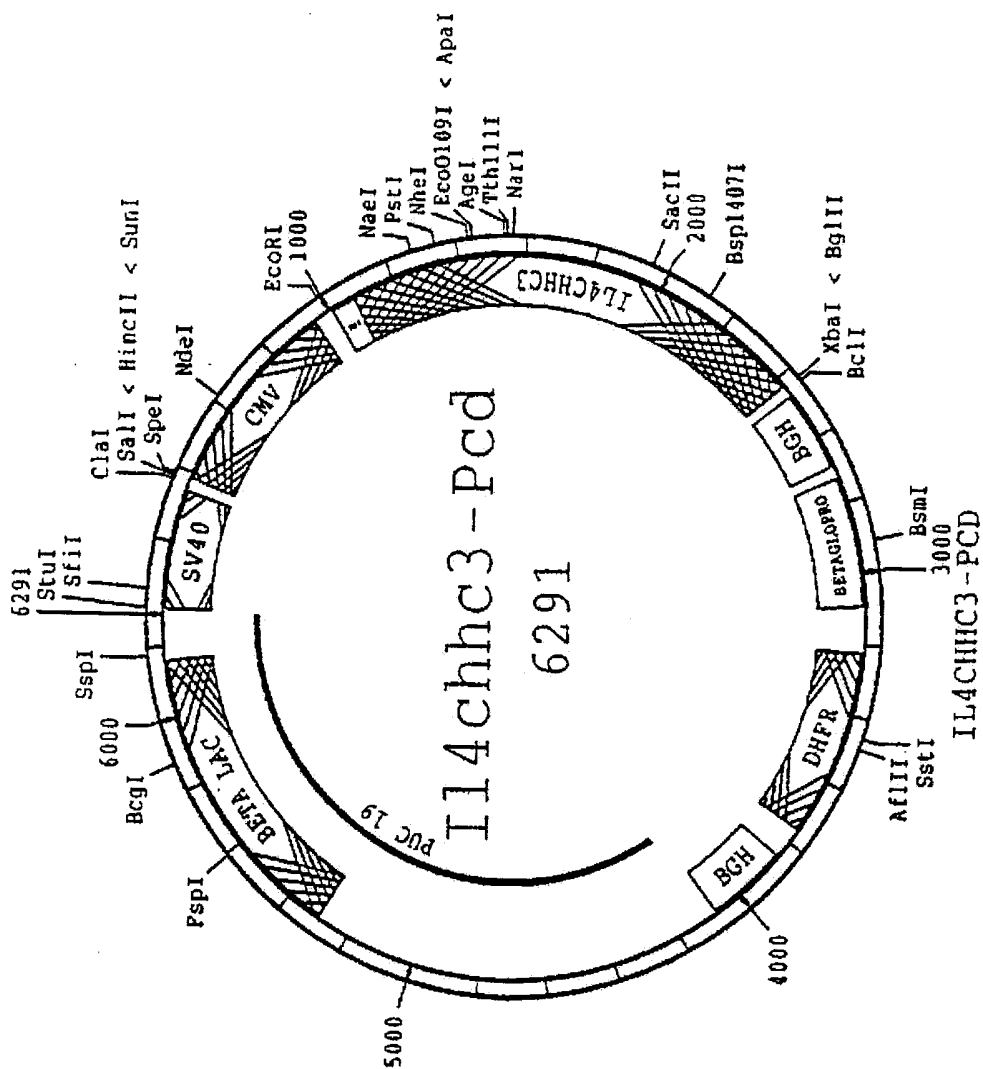
ATG	GTG	TTG	CAG	ACC	CAG	GTC	TTC	ATT	TCT	CTG	TTG	CTC	39
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	
1				5					10				
TGG	ATC	TCT	GGT	GCC	TAC								
Trp	Ile	Ser	Gly	Ala	Tyr								
	15												

Obr. 6B

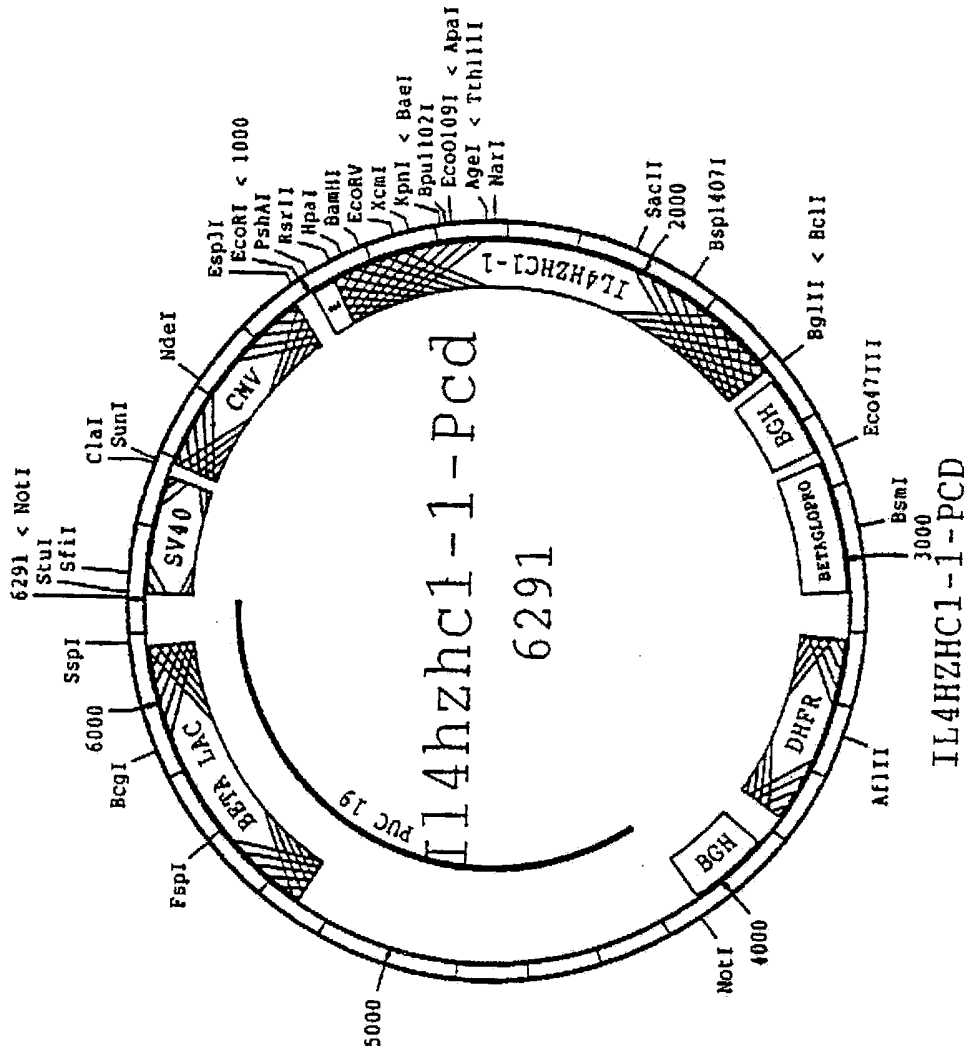
Signální sekvence
 Nukleotid SEQ ID č. 7
 Aminokyselina SEQ ID č. 8

ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	39
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	
1				5					10				
GCT	ACA	GGT	GTC	CAC	TCC	GAT	ATC	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	78
Ala	Thr	Gly	Val	His	Ser	Asp							
	15					20							

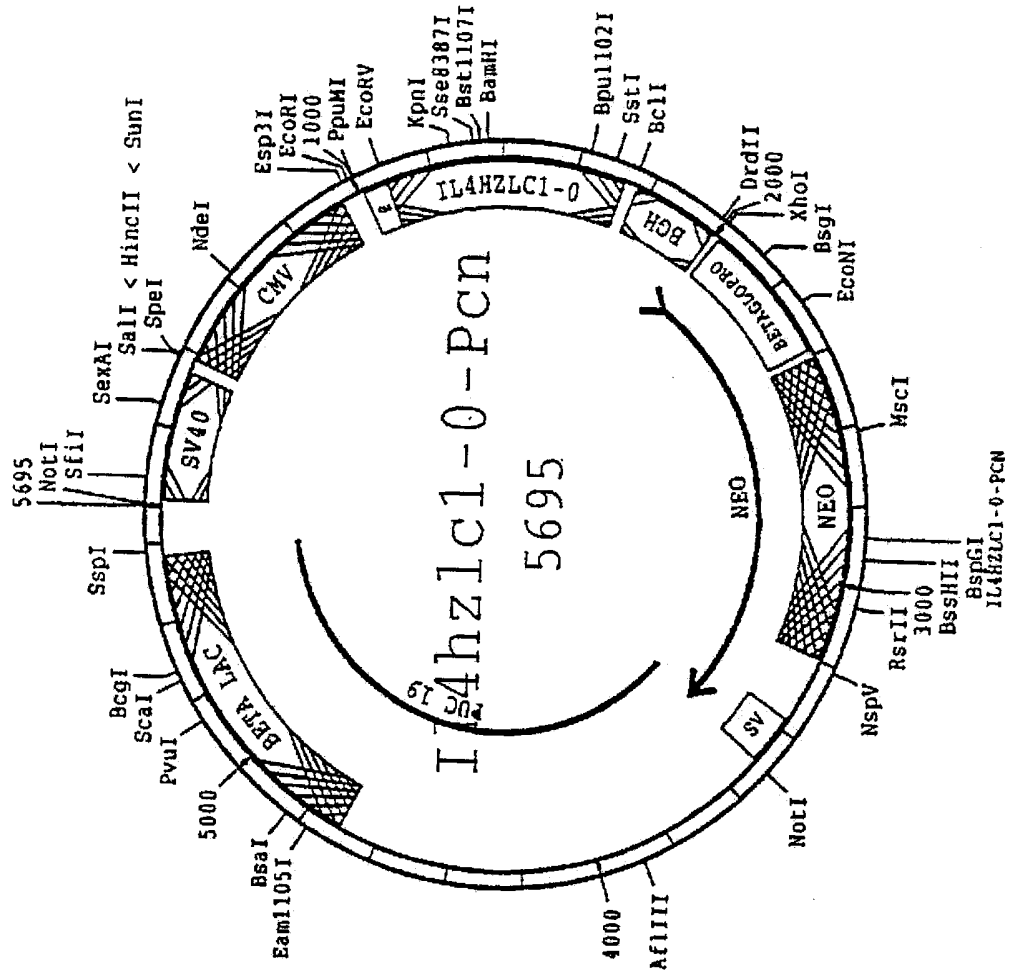
Obr. 7



Obr. 9



Obr. 10



Konec dokumentu