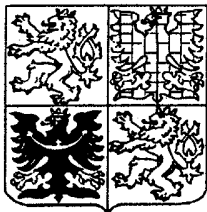


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 07.09.94
(32) 07.09.93, 14.10.93
(31) 93/117366, 93/136783
(33) US, US
(40) 16.10.96

(21) 698-96

(13) A3

6(51)

C 07 K 16/24
C 07 K 16/46
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
C 12 N 15/13
A 61 K 39/395

- (71) SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US;
SMITHKLINE BEECHAM p.l.c., Brentford, GB;
- (72) Holmes Stephen Dudley, Epsom, GB;
Gross Mitchell Stuart, Wayne, PA, US;
Sylvester Daniel R., Phoenixville, PA, US;
- (54) **Rekombinantní IL4 protilátky použitelné pro
ošetřování chorob zprostředkovaných IL4**
- (57) Chimérické a humanizované IL4 MABa odvozené od vyso-
ce afinitních MABa a farmaceutické prostředky s jejich ob-
sahem. Rekombinantní IL4 protilátky jsou vhodné pro
ošetřování chorob zprostředkovaných IL4.

PV 698-96

- 1 -

č.j.	12692
DOŠLO	12. IV. 96
URAD	PŘEMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

Rekombinantní IL4 protilátky použitelné pro ošetřování chorob zprostředkovaných IL4

Oblast techniky

Tato přihláška vynálezu je pokračovací částí USSN 08/136 783, podané dne 14. října 1993, která je pokračováním USSN 08/117 366, podané dne 7. září 1993, přičemž obě tyto přihlášky jsou zahrnuty odkazem na jejich celý obsah.

Tento vynález se obecně týká oblasti fúze proteinů a dále se týká proteinů, které jsou vhodné pro ošetřování a diagnostiku stavů zprostředkovaných IL4 a nadměrnou produkcí IgE, a zvláště se týká chimérických a humanizovaných IL4 protilátek.

Dosavadní stav techniky

Atopické alergické choroby spadají do rozsahu relativně lehkých onemocnění, jako je sezónní rinitida a konjunktivitida, vážnějších chorob, jako je atopická dermatitida a atopické astma, a onemocnění ohrožujících život, jako je anafylaktický šok. Spojnicí těchto stavů je imunní 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 desensibilizačních 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 eosinofilu 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

První znak tohoto vynálezu se týká fúzovaného proteinu, který má vazebnou afinitu pro lidský interleukin-4, který zahrnuje komplementární determinující úseky (CDRs) odvozené od ne-lidských neutralizujících monoklonálních protilátek (tedy jiných než člověka) (MAb), charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL4 a první partner fúze, kterým je alespoň jeden a výhodně všechny komplementární determinující úseky (CDRs) prvního partnera fúze, je nahrazen CDRs z monoklonální protilátky jiné než člověka (MAB). Neutralizující monoklonální protilátka jiná než člověka se může zvolit ze

č.j.	049568
DOŠLO	
08. VII. 96	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

souboru sestávajícího z 3B9 a 6A1, jak je popsáno podrobněji v detailním popisu. Výhodně je fúzovaný protein operativně vázán k druhému fúzovanému proteinu, který zahrnuje celý nebo část imunoglobulinového konstantního řetězce.

Ze souvisejícího hlediska tento vynález poskytuje CDRs odvozené od neutralizujících monoklonálních protilátek jiných než člověka (MAb), které jsou charakterizovány disociační konstantou rovnou nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL4 a molekulami nukleové kyseliny kodujícími takový CDRs.

Z jiného hlediska tento vynález poskytuje humanizované protilátky, které mají alespoň jeden, výhodně šest komplementárně determinujících úseků (CDRs) odvozených od neutralizujících monoklonálních protilátek jiných než člověka (MAb), charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL4.

Ještě jiný znak poskytuje chimérickou protilátku obsahující konstantní úseky lidského těžkého a lehkého řetězce a variabilní úseky těžkého a lehkého řetězce, odvozené od neutralizujících monoklonálních protilátek jiných než člověka (MAb), charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL-4.

Ještě jiný znak tohoto vynálezu se týká farmaceutického prostředku, který obsahuje jeden (nebo větší počet) výše popsaných fúzovaných proteinů nebo MAbs (například humanizovaných, chimérických a podobně) a farmaceuticky přijatelnou nosnou látku.

Ještě jiný znak tohoto vynálezu se týká způsobů a komponent vhodných při rekombinantní produkci fúzovaných

proteinů, MAbs (například humanizovaných, chimérických a podobně), jejich CDRs, Fab nebo $F(ab)_2$ nebo jejich analogů, které jsou odvozeny od neutralizujících monoklonálních antilátek jiných než člověka (MAb), charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL-4. Tyto komponenty zahrnují izolované sekvence nukleové kyseliny kódující stejné sekvence, rekombinantní plasmidy obsahující sekvence nukleové kyseliny pod řízením zvolených regulačních sekvencí schopných řízení jejich exprese v buňkách hostitele a hostitelské buňky (výhodně buňky savců) transfekované s rekombinantními plasmidy. Produkční způsoby zahrnují kultivaci a transfekaci buněčné linie hostitele podle tohoto vynálezu za takových podmínek, že protilátka, výhodně humanizovaná protilátka, je exprimována v těchto buňkách a izolování exprimovaného produktu z těchto buněk.

Ještě jiným znakem tohoto vynálezu je metoda diagnózy alergií a jiných stavů spojených s přebytkem produkce imunoglobulinu E u člověka, která zahrnuje uvedení vzorku biologické kapaliny do styku s fúzovanými proteiny, MAbs (například humanizovanými, chimérickými a podobně) a Fabs podle tohoto vynálezu a testování výskytu vázání mezi fúzovaným proteinem, MAb nebo Fab a lidským interleukinem-4.

Jiný příbuzný znak se týká způsobu vyšetření monoklonálních protilátek, které mají vysoký titr pro lidský interleukin-4, a který zahrnuje:

a) přípravu hybridomové buněčné linie vyznačené sekrecí monoklonální protilátky do lidského interleukinu-4 a

b) vyšetření této hybridomové buněčné linie s aldehydem kondenzovaným na lidský interleukin-4 nebo s biotinylovaným lidským interleukinem-4. Výhodně se hybridomová buněčná linie vyšetřuje s biotinylovaným lidským interleukinem-4.

Vynález také poskytuje neutralizující MAb, který má vysokou afinitu pro IL4, fragment Fab nebo jeho fragment $F(ab')_2$, produkovaný vyšetřením sbírky hybridomových produktů s aldehydem kondenzovaným na lidský interleukin-4 nebo biotinylovaný lidský interleukin-4.

Z jiného hlediska tento vynález poskytuje neutralizující monoklonální protilátky hlodavců, specifické pro lidský interleukin-4, které mají vazebnou afinitu vyznačenou disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M. Příkladem takových monoklonálních protilátek je myší MAb, 3M9 a krysí MAb, 6A1 a jiné MAb, které mají stejné identifikační charakteristiky (například vázání na stejný epitop nebo stejné epitopy jako 3B9 nebo 6A1 se specificitou pro lidský interleukin-4 a disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M). Jiným znakem tohoto vynálezu je hybridom 3426A11C1B9.

Další znaky a výhody tohoto vynálezu jsou popsány v dále začleněném detailním popisu výhodných provedení tohoto vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 (SEQ ID č. 1 a 2) ilustruje variabilní úsek lehkého řetězce (aminokyseliny 21 až 132) pro myši IL4 protilátku 3B9 a lidskou/myši 3B9 chimérickou protilátku, stejně jako nativní signální sekvenci (aminokyseliny 1 až 20). Podtržené části ukazují CRDs (SEQ ID č. 15 a 16, SEQ ID č. 17 a 18 a SEQ ID č. 19 a 20).

Obr. 2 (SEQ ID č. 3 a 4) ilustruje variabilní úsek těžkého řetězce (aminokyseliny 20 až 140) myši protilátky a nativní signální sekvenci (aminokyseliny 1 až 19). Podtržené části ukazují CRDs (SEQ ID č. 21 a 22, SEQ ID č. 23 a 24 a SEQ ID č. 25 a 26).

Obr. 3 (SEQ ID č. 9 a 10) ilustruje variabilní úsek těžkého řetězce (aminokyseliny 21 až 141) lidské/myši 3B9 chimérické protilátky, stejně jako její signální sekvenci (aminokyseliny 1 až 19, SEQ ID č. 5 a 6). Podtržené části ukazují CRDs odvozené od 3B9 (SEQ ID č. 21 a 22, SEQ ID č. 23 a 24 a SEQ ID č. 25 a 26).

Obr. 4 (SEQ ID č. 11 a 12) ilustruje variabilní úsek těžkého řetězce (aminokyseliny 20 až 141) humanizované 3B9 protilátky a signální sekvenci (aminokyseliny 1 až 19, SEQ ID č. 5 a 6). Podtržené části ukazují CRDs odvozené od 3B9 (SEQ ID č. 54 a 22, SEQ ID č. 55 a 24 a SEQ ID č. 56 a 26).

Obr. 5 (SEQ ID č. 13 a 14) ilustruje variabilní úsek lehkého řetězce (aminokyseliny 21 až 131) humanizované 3B9 protilátky a signální sekvenci (aminokyseliny 1 až 20, SEQ ID č. 7 a 8). Podtržené části ukazují CRDs odvozené od 3B9 (SEQ ID č. 53 a 16, SEQ ID č. 17 a 18 a SEQ ID č. 27 a 28).

Obr. 6A (SEQ ID č. 5 a 6) je signální sekvence těžkého řetězce použitá v příkladu 4 dále.

Obr. 6B (SEQ ID č. 7 a 8) je signální sekvence lehkého řetězce použitá v příkladu 4 dále.

Obr. 7 je schematické znázornění plasmidu pIL4chhc3-pcd, použitého k expresi chimérického IL-4 těžkého řetězce v savčích buňkách. Plasmid obsahuje β laktamázový gen (BETA LAC), SV-40, který pochází z replikace (SV40), promotorovou sekvenci cytomegaloviru (CMV), signální sekvenci, chimérický variabilní těžký řetězec z SEQ ID č. 9 a 10, konstatní úsek lidského těžkého řetězce, poly A signál z hovězího růstového hormonu (BGH), β -globinový promotor (beta glopro), dihydrofolát reduktázový gen (DHFR) a jiný BGH sekvenční poly A signál na pozadí pUC19.

Obr. 8 je schematické znázornění plasmidu pIL4chlc-pcdn použitého k expresi chimérického IL4 variabilního úseku lehkého řetězce SEQ ID č. 1 a 2 v savčích buňkách. Plasmid se odlišuje od plasmidu z obr. 7 obsahem variabilního úseku chimérického lehkého řetězce spíše než chimérického těžkého řetězce, konstantním úsekem lidského lehkého řetězce a neomycinovým genem (Neo), kromě DHFR.

Obr. 9 je schematické znázornění plasmidu pIL4zhc-1-pcd použitého k expresi variabilního úseku syntetického IL4 těžkého řetězce SEQ ID č. 11 a 12 v savčích buňkách. Plasmid se odlišuje od plasmidu z obr. 7 obsahem variabilního úseku humanizovaného lehkého řetězce spíše než chimérického těžkého řetězce.

Obr. 10 je schematické znázornění plasmidu

pIL4hzlcl1-0-Pcn použitého k expresi variabilního úseku humanizovaného IL4 lehkého řetězce SEQ ID č. 13 a 14 v savčích buňkách. Plasmid se odlišuje od plasmidu z obr. 8 obsahem variabilního úseku humanizovaného lehkého řetězce spíše než chimérického lehkého řetězce, a nekoduje DHFR gen.

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález se týká rozmanitých protilátek, jejich fragmentů a fúzovaných proteinů zvláště lidských protilátek, které jsou vyznačeny lidskou IL4 vazebnou specificitou, neutralizující aktivitou a vysokou afinitou pro lidský IL4, jako například u myši MAb 3B9 nebo krysí MAb 6A1. Tyto produkty jsou vhodné v terapeutických a farmaceutických prostředcích pro ošetřování alergických reakcí zprostředkovaných IL4 a imunoglobulinem E. Tyto produkty jsou také vhodné při diagnóze stavu zprostředkovaného IL4, prováděné měřením (například testem stanovujícím enzym vázaný na imunosorbent /ELISA/) hladin cirkulujícího endogenního IL4 v lidech.

1. Definice

"Fúzovaný protein" se vztahuje k proteinu kodovanému fúzovanému molekulou, která se může dosáhnout expresí zvolené hostitelské buňky. Takovými fúzovanými proteiny jsou konstruované (engineered) protilátky, například chimérické nebo humanizované protilátky, nebo fragmenty protilátky postrádající všechny nebo část konstantních úseků imunoglobulinu, například Fv, Fab nebo F(ab)₂ a podobně.

"Fúzovaná molekula" se vztahuje k sekvenci nukleové kyseliny kodující komplementární determinující úseky (CDRs)

z ne-lidského imunoglobulinu, které jsou insertovány do prvního partnera fúze, zahrnujícího variabilní sekvence lidské základní struktury. Podle potřeby je první partner fúze operativně vázán k druhému partneru fúze.

"První partner fúze" se vztahuje k sekvenci nukleové kyseliny kodující variabilní úsek lidské základní struktury nebo lidského imunoglobulinu, ve které nativní (nebo v přírodě se vyskytující) CDRs jsou nahrazeny CDRs donorové protilátky. Lidským variabilním úsekem může být imunoglobulinový těžký řetězec, lehký řetězec (nebo oba řetězce), jejich analog nebo jejich funkční fragment. Takové CDRs nebo CDR úseky, umístěné ve variabilním úseku protilátek (imunoglobulinů) mohou být stanoveny známými způsoby 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 umístění CDRs. Kromě toho jsou známy počítačové programy, které jsou vhodné pro identifikaci CDR úseků a/nebo struktur.

Výraz "vysoký titr" se vztahuje k protilátce, která má vazebnou afinitu charakterizovanou hodnotou K_d , která je rovná nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL4.

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

"Druhý partner fúze" se vztahuje k jiné nukleotidové sekvenci kodující protein nebo peptid, ke kterému je první partner fúze fúzován do základní struktury nebo pomocí obvyklé linkerové (spojovníkové) sekvence, to znamená

operativně vázán. Výhodně jím je imunoglobulin. Druhý partner fúze může zahrnovat sekvenci nukleové kyseliny kodující celý konstantní úsek pro stejnou (to znamená homologní - první a druhé proteiny fúze jsou odvozeny od stejného zdroje) nebo přídatnou (to znamená heterologní) protilátku, která je středem zájmu. Přitom může jít o imunoglobulinový těžký řetězec nebo lehký řetězec (nebo oba řetězce jako část jediného peptidu). Druhý partner fúze není omezen na zvláštní imunoglobulinovou třídu nebo isotyp. Kromě toho druhý partner fúze může zahrnovat část imunoglobulinového konstantního úseku, jako se nachází v Fab nebo $F(ab)_2$ (to znamená oddělenou část příslušného lidského konstantního úseku nebo úseku základní struktury). Takový druhý partner fúze může také zahrnovat sekvenci kodující integrální membránový protein exponovaný na vnějším povrchu hostitelské buňky, například jako část sbírky projevující fágy nebo sekvence kodující protein pro analytické nebo diagnostické stanovení, například peroxidáza křenu selského, β -galaktidáza a podobně.

Výrazy F_v , F_c , Fab nebo $F(ab)_2$ se používají ve svém normálním významu (viz například Harlow a kol., *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory /1988/).

Pokud se zde používá výraz "konstruovaná protilátka", popisuje typ fúze proteinu, to znamená syntetickou protilátku (například chimérickou nebo humanizovanou protilátku), ve které část variabilní domény lehkého a/nebo těžkého řetězce zvoleného akceptoru protilátky je nahrazena analogickými částmi z jednoho nebo většího počtu donorových protilátek, které mají specificitu pro zvolený epitop. Například takové molekuly mohou zahrnovat protilátky charakterizované humanizovaným těžkým řetězcem spojeným s nemodifikovaným lehkým řetězcem (nebo chimérickým lehkým řetězcem) nebo

naopak. Konstruované protilátky mohou být také charakterizovány alternací sekvencí nukleové kyseliny kodující variabilní doménu lehkého a/nebo těžkého řetězce zvoleného akceptoru protilátky v úseku základní struktury, za účelem zachování vazebné specificity donorové protilátky. Tyto protilátky mohou zahrnovat náhradu jedné nebo většího počtu CRs (výhodně všech) z akceptorové protilátky CDRs z donorové protilátky, jako je zde popsáno.

"Chimérická protilátka" se vztahuje k typu konstruované protilátky, která obsahuje přirozeně se vyskytující variabilní úsek (lehký řetězec nebo těžké řetězce), dovozený od donorové protilátky ve spojení s konstantními úseky lehkého a těžkého řetězce odvozenými od akceptorové protilátky.

"Humanizovaná protilátka" se vztahuje k typu konstruované protilátky, která má své CDRs odvozené od ne-lidského donoru imunoglobulinu, přičemž zbývající části molekuly odvozené od imunoglobulinu jsou odvozeny od jednoho (nebo většího počtu) lidských imunoglobulinů. Kromě toho zbytek základní struktury může být pozměněn, aby se chránila 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/).

Výraz "donorová protilátka" se vztahuje k protilátce (polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní), která přispívá k sekvencím nukleové kyseliny svých variabilních úseků, CDRs nebo jiných funkčních fragmentů nebo jejich analogů k prvnímu partneru fúze, takže skýtá fúzi molekuly a výsledný exprimovaný kondenzovaný protein s antigenovou specificitou a neutralizující aktivní charakteristikou

donorové protilátky. Jednou donorovou protilátkou vhodnou pro použití podle tohoto vynálezu je ne-lidská neutralizující monoklonální protilátka (například myší protilátka), označená jako 3B9. Protilátka 3B9 je definována jako vysokého titru, lidská IL4 specifická (to znamená nerozpoznatelná hovězí nebo myší IL4) neutralizující protilátka isotypu IgG₁, která má variabilní lehký řetězec DNA a aminokyselinové sekvence SEQ ID č. 1 a 2 a variabilní těžký řetězec DNA a aminokyselinové sekvence SEQ ID č. 3 a 4 na vhodném myším IgG konstantním úseku.

Výraz "akceptorová protilátka" ve vztahuje k protilátce (polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní) heterologní k donorové protilátce, která přispívá ke všem (nebo některým částem, ale výhodně všem) sekvencím nukleové kyseliny kodující své úseky základní struktury s těžkým a/nebo lehkým řetězcem a/nebo své konstantní úseky s těžkým a/nebo lehkým řetězcem k druhému partnerovi fúze. Výhodně lidská protilátka je akceptorovou protilátkou.

"CDRs" jsou definovány jako komplementární determinující úseky aminokyselinových sekvencí protilátky, které jsou hypervariabilními 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/). Jsou tři těžké řetězce a tři lehké řetězce CDRs (neboli CDR úseky) ve variabilních částech imunoglobulinu. Tak "CDRs", jak se zde používá, se vztahuje ke všem třem těžkým řetězcům CDRs nebo ke všem třem lehkým řetězcům CDRs (nebo jak všem těžkým, tak všem lehkým řetězcům CDRs, pokud je to vhodné).

CDRs poskytují většinu kontaktních zbytků pro vázání

protilátky k antigenu nebo epitopu. CDRs zajímavé při tomto vynálezu jsou odvozeny od variabilních sekvencí těžkých a lehkých řetězců donorové protilátky a zahrnují analogy přirozeně se vyskytujících CDRs, jejichž analogy se také podílejí na stejné antigenové vazebné specificitě a/nebo neutralizující schopnosti nebo zachovávají tuto specificitu a/nebo schopnost jako donorová protilátka, od které jsou odvozeny.

Výrazem "podílet se na antigenové vazebné specificitě nebo neutralizující schopnosti" se rozumí například to, že třebaže MAb 3B9 může být charakterizován určitou úrovní antigenové afinity a CDR kodován sekvencí nukleové kyseliny 3B9 ve vhodném strukturním prostředí, může mít nižší nebo vyšší afinitu, a je očekáváno, že CDRs 3B9 v takových prostředích nicméně rozpozná stejný epitop nebo stejné epitopy jako 3B9. Příkladně těžký řetězec CDRs 3B9 zahrnuje SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24 a SEQ ID č. 26 a příkladně lehký řetězec CDRs 3B9 zahrnuje SEQ ID č. 16, SEQ ID č. 18 a SEQ ID č. 20.

"Funkčním fragmentem" je částečně variabilní sekvence těžkého nebo lehkého řetězce (například malé delece na koncové aminoskupině nebo karboxyskupině variabilního úseku imunoglobulinu), co zachovává stejnou antigenovou vazebnou specificitu a/nebo neutralizační schopnost 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 přesmykem volných aminokyselin (to je ne více než 10), kde modifikace dovoluje aminokyselinové sekvenci zachovat si biologické charakteris-

tiky, například antigenovou specificitu a vysoký titr nebo afinitu, z nemodifikované sekvence. Například tiché mutace se mohou konstruovat substituční cestou, k vytvoření endonukleasových restričních míst v CDR úsecích nebo míst tyto úseky obklopujících.

Analogy mohou také vznikat jako alelické variace. Výraz "alelická variace nebo modifikace" je změna v sekvenci nukleové kyseliny kodující aminokyselinové nebo peptidové sekvence podle tohoto vynálezu. Takové variace nebo modifikace mohou být důsledkem degenerace genetického kodu nebo mohou být záměrně konstruovány k poskytnutí požadovaných charakteristik. Tyto variace nebo modifikace mohou nebo nemusí mít za výsledek změny v některé kodující aminokyselinové sekvenci. Například aminokyselinové sekvence lehkého řetězce CDR SEQ ID č. 16 jsou identické pro nativní myši a humanizovanou 3B9 protilátku. Avšak tato CDR sekvence je kodována jak SEQ ID č. 15, tak SEQ ID č. 53. Podobně CDR SEQ ID č. 22 je kodována jak SEQ ID č. 21, tak SEQ ID č. 54, CDR SEQ ID č. 24 je kodována jak SEQ ID č. 23, tak SEQ ID č. 55 a CDR SEQ ID č. 26 je kodována jak SEQ ID č. 25, tak SEQ ID č. 56.

Výraz "efektorové prostředky" se vztahuje k neproteinovým nosným molekulám, ke kterým fúzované proteiny a/nebo přirozený nebo syntetický lehký nebo těžký řetězec donorové protilátky nebo jiné fragmenty donorové protilátky mohou být připojeny obvyklým způsobem. Takové neproteinové nosné látky zahrnují běžné nosné látky používané v diagnostické oblasti, například polystyrenové nebo jiné plastické kuličky, polysacharidy, například jako se používají v systému BIAcore (Pharmacia), nebo jiné neproteinové substance používané v lékařské oblasti a bezpečné pro

podávání lidem a zvířatům. Jiné efektorové prostředky mohou zahrnovat makrocyklus, pro chelatizaci atomů těžkých kovů, nebo radioisotopy. Tyto efektorové prostředky mohou být vhodné ke zvýšení poločasu životnosti fúzovaných proteinů, například polyethylenglykolu.

II. Vysoce afinitní IL4 monoklonální protilátky

Pro použití při konstrukci protilátek, fragmentů a kondenzovaných proteinů podle tohoto vynálezu se mohou použít ne-lidské druhy (například hovězí, ovčí, primátové, hlodavcové, jako například myši a krysí, a podobně) k vytvoření požadovaného imunoglobulinu, jaký je očekáván s přirozeným lidským IL4 nebo jeho peptidovým epitopem. Obvyklý hybridomový technický postup se používá k dosažení hybridomové buněčné linie sekocující ne-lidský MAb k IL4. Takové hybridomy se potom vyšetřují za použití IL4 kovalentně vázaného k desce s 96 jamkami nebo alternativně s biotinylovaným IL4 pro použití při testování, jak je popsáno podrobně v příkladu 2 dále. Tak jedním znakem tohoto vynálezu je způsob stanovení MAbů pro lidský IL4, při kterém se testovací systémy vyhýbají denaturaci IL4. Při takovém způsobu bylo zjištěno, že se může stanovit vysoký titer (nebo vysoká afinita) MAbů k lidskému IL4.

Jako jeden příklad se nejprve uvádí produkce o vysokém titru neutralizujícího MAb z myšního donoru. MAb 3B9, který je vhodnou myší (donorovou) protilátkou pro použití při vývoji chimérické nebo humanizované protilátky, je popsán podrobně v příkladu 1, který je uveden dále. 3B9 MAb je charakterizován antigenovou 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 IL4 fragmentu Fab z tohoto

3B9 je menší než přibližně 3×10^{-10} M. Epitop této protilátky by nebyl mapován k IL4 s lineárními peptidy, a proto epitop se pokládá za vázaný k přiléhajícímu epitopu. Vzor vázání navrhuje vazebné místo v úseku smyčky B-C (zbytky 60 až 69) —————> C helix (zbytky 70 až 93). Tyto úseky se vztahují k označení na mapě, kterou poskytl 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., 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/, a které se zde uvádějí jako součást stavu techniky.

Jinou žádoucí donorovou protilátkou je krysí MAb, 6A1. Způsob přípravy tohoto MAb je uveden v příkladu 7 dále. Tento MAb je charakterizován 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, cílový epitop tohoto 6A1 nemapuje s IL4 lineárními peptidy, a epitop je proto pokládán za nepřiléhající a trojrozměrný. Vzor vázání k IL4 muteinům a jejich biologická aktivita ukazují vázání v D helixovém úseku lidského IL4 (aminokyselinové zbytky 109 až 127), nejpravděpodobněji okolo tyrosinu na aminokyselinovém zbytku # 124.

Tento vynález není omezen na použití 3B9 MAb, 6A1 MAb nebo jejich hypervariabilních (to znamená CDR) sekvencí. Jakýkoli jiný vhodně vysoký titr IL4 protilátky, který je charakterizován disociační konstantou rovnou nebo menší než $2,0 \times 10^{-10}$ M pro lidský IL4 a odpovídající anti-IL4 CDRs, může být použit jako jejich náhrada. Kdekoli v následujícím popisu je donorová protilátka uvedena jako 3B9 nebo 6A1, toto

označení je provedeno pouze pro ilustraci a zjednodušení popisu.

III. Protilátkové fragmenty

Tento vynález také zahrnuje použití Fab fragmentů nebo $F(ab')_2$ fragmentů odvozených od MAbs směřujících proti lidskému IL4. Tyto fragmenty jsou vhodné jako ochranné prostředky in vivo proti stavům zprostředkovaným IL4 a IgE nebo in vitro jako část diagnostiky IL4. Fragment Fab obsahuje celý lehký řetězec a koncovou část těžkého řetězce ukončeného aminoskupinou. Fragment $F(ab')_2$ je fragment tvořený dvěma fragmenty Fab, které jsou vázány disulfidovými vazbami. MAbs 3B9, 6A1 a jiné podobné vysoce afinitní IL4 vazebné protilátky skýtají zdroje fragmentů Fab a $F(ab')_2$, které se mohou dostat obvyklými způsoby, například štěpením MAb s vhodnými proteolytickými enzymy, papainem a/nebo pepsinem, nebo rekombinantními způsoby. Tyto fragmenty Fab a $F(ab')_2$ jsou samy vhodné jako terapeutické, profylaktické nebo diagnostické prostředky a jako donory sekvencí zahrnujících variabilní úseky a CDR sekvence vhodné pro tvorbu rekombinantních nebo humanizovaných protilátek, jak je zde popsáno.

IV. Zajímavé anti-IL4 aminokyselinové a nukleotidové sekvence

MAb 3B9 nebo jiné protilátky popsané výše mohou přispět k sekvencím, jako jsou sekvence peptidů s variabilním těžkým a/nebo lehkým řetězcem, sekvence se základní strukturou, CDR sekvence, funkční fragmenty a jejich analogy, a sekvence nukleové kyseliny je kodující, vhodným při navrhování a získávání různých fúzovaných proteinů (včetně

konstruovaných protilátek), které jsou vyznačeny antigenovou vazebnou specificitou donorové protilátky.

Jako jeden příklad tak tento vynález poskytuje sekvence s variabilním lehkým řetězcem a variabilním těžkým řetězcem z myši IL4 protilátky 3B9 a sekvence od nich odvozené. Variabilní úsek 3B9 těžkého řetězce je charakterizován aminokyselinovými zbytky 20 až 140 z SEQ ID č. 4. CDR úseky jsou uvedeny podtržené na obr. 2 a jsou v SEQ ID č. 22, SEQ ID č. 24 a SEQ ID č. 26. Klonový variabilní úsek 3B9 lehkého řetězce je charakterizován aminokyselinovými zbytky 21 až 132 na obr. 1 (SEQ ID č. 2). CDR úseky 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).

Dostává se variabilní úsek chimérického těžkého řetězce, signální nukleotid a aminokyselinové sekvence. Tyto sekvence jsou identické s 3B9 těžkým řetězcem s výjimkou signální sekvence. Signální sekvence chimérického těžkého řetězce je v SEQ ID č. 5 a 6. CDR úseky jsou uvedeny podtržené na obr. 3 a jsou identické v aminokyselinové sekvenci k přirozeným myším CDRs (SEQ ID č. 21 až 26). Variabilní úsek chimérického lehkého řetězce nukleotidových a aminokyselinových sekvencí je identický k nemodifikovaným 3B9 sekvencím (aminokyselinové zbytky 21 až 132 SEQ ID č. 2), co umožňuje použití přirozených myších signálních sekvencí (aminokyselinové zbytky 1 až 20 SEQ ID č. 2).

Variabilní úseky humanizovaného těžkého řetězce a signální sekvence jsou ilustrovány na obr. 4 (SEQ ID č. 11 a 12). Signální sekvence je také poskytnuta 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. CDR aminokyselinové sekvence z tohoto konstruktů jsou identické k přirozeným myším CDRs a CDRs s chimérickým těžkým řetězcem a jsou opatřeny SEQ ID č. 22 (kodovaným SEQ ID č. 54), SEQ ID č. 24 (kodovaným SEQ ID č. 55) a SEQ ID č. 56 (kodovaným SEQ ID č. 26).

Příkladná (syntetická) humanizovaná variabilní sekvence s lehkým řetězcem je ilustrována na obr. 5 (SEQ ID č. 13 a 14). Signální sekvence má rozsah aminokyselinových zbytků 1 až 19 SEQ ID č. 8. CDR sekvence z tohoto obr. jsou označeny podtržením a odlišují se od CDR přirozené myši CDR jedinou aminokyselinou ze SEQ ID č. 20. Tak CDRs humanizovaného lehkého řetězce je poskytnuta 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, kodující variabilní lehký řetězec a těžký řetězec peptidových sekvencí, se používají v nemodifikované formě nebo se syntetizují k zavedení žádoucích modifikací, například restričních míst. Izolované přirozené se vyskytující nebo alternativně syntetické sekvence nukleové kyseliny, které jsou odvozeny od MAb 3B9 nebo od jiných žádoucích IL4 protilátek s vysokým titrem, mohou popřípadě obsahovat restriční místa, k usnadnění zavedení nebo ligace do vhodné sekvence nukleové kyseliny, stejně tak kodující požadovaný úsek základní struktury protilátky, ligující s mutagenovanými CDRs nebo dosahující fúzi se sekvencí nukleové kyseliny, která koduje vybraného druhého partnera fúze.

Pokud se bere v úvahu degenerace genetického kodu,

mohou se konstruovat různé kodující sekvence, které kodují aminokyselinové sekvence s variabilním těžkým a lehkým řetězcem a CDR sekvence podle tohoto vynálezu, stejně jako jejich funkční fragmenty a analogy, které se podílejí na antigenové specificitě donorové protilátky. Izolované sekvence nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu nebo jejich fragmenty kodující peptidové sekvence s variabilním řetězcem nebo CDRs se mohou použít k přípravě fúzovaných proteinů, chimerických nebo humanizovaných protilátek nebo jiných konstruovaných protilátek podle tohoto vynálezu, pokud se účinně kombinují s druhým partnerem fúze.

Tyto sekvence jsou také vhodné pro mutagenní zavedení specifických změn do sekvencí nukleové kyseliny kodujících CDRs nebo úseků základní struktury a pro inkorporaci výsledné modifikované nebo fúzované sekvence nukleové kyseliny do plasmidu pro expresi. Například tiché substituce v nukleotidové sekvenci úseků základní struktury a CDR kodujících úseků se používají k vytvoření restričních míst na enzymu, které usnadňují inserci úseků mutagenované CDR (a/nebo základní struktury). Tyto CDR úseky se používají při konstrukci humanizované protilátky podle tohoto vynálezu.

Mělo by se poznamenat, že kromě izolovaných sekvencí nukleové kyseliny kodujících části fúzovaného proteinu a protilátek zde popsaných, se mohou používat jiné takové sekvence nukleové kyseliny, jako sekvence komplementární k přirozeným sekvencím. Vhodné DNA sekvence zahrnují sekvence, které hybridizují za 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 příklad jedné takové přísné hybridizační podmínky se uvádí hybridizace v 4XSSC za teploty 65 °C

a potom promytí v 0,1XSSC za teploty 65 °C během 1 hodiny. Jiným příkladem přísných hybridizačních podmínek je 4XSSC v 50% formamidu za teploty 42 °C. Výhodně tyto hybridizační DNA sekvence mají délku alespoň přibližně 18 nukleotidů, to znamená okolo velikosti CDR.

V. Fúze molekul a fúze proteinů

Fúzované molekuly mohou kodovat fúzované proteiny, které zahrnují konstruované protilátky, jako chimérické protilátky a humanizované protilátky. Vhodná fúzovaná molekula obsahuje CDR sekvence kodující peptidy, které mají antigenovou specificitu IL4 protilátky, výhodně vysokou afinitu protilátky, jaká se dosahuje podle tohoto vynálezu insercí do prvního partnera fúze (úseku humanizované základní struktury nebo variabilního úseku lidského imunoglobulinu).

Výhodně je první partner fúze účinně vázán k druhému partneru fúze. Druhý partner fúze je definován výše a může zahrnovat sekvenci kodující zajímavý úsek druhé protilátky, například Fc úsek. Druzí partneři fúze mohou také obsahovat sekvence kodující jiné imunoglobuliny, ke kterým konstatní úseky lehkého nebo těžkého řetězce se fúzují v základní struktuře nebo pomocí linkerové sekvence. Konstruované protilátky zaměřené proti funkčním fragmentům nebo analogům IL4 mohou být určeny ke zjištění zvýšeného vázání se stejnou protilátkou.

Druhý partner fúze může být také spojen s efektorovými prostředky, jak jsou vymezeny výše, které zahrnují neproteinové nosné molekuly, ke kterým druhý partner fúze může být účinně vázán obvyklými způsoby.

Fúze neboli vázání mezi druhými partnery fúze, například protilátkovými sekvencemi, a efektorovým prostředkem se může provádět libovolným vhodným způsobem, například pomocí obvyklých kovalentních nebo ion^tových vazeb, fúzemi proteinů nebo hetero-bifunkčními síťujícími linkery, jako je karbodiimid, gultaraldehyd a podobně. Takové technické postupy jsou známy v oboru a již popsány v obvyklých chemických a biochemických textech.

Kromě toho obvyklé linkerové sekvence, které jednoduše poskytují požadované množství prostoru mezi druhým partnerem fúze a efektorovým prostředkem, mohou být také konstruovány ve fúzované molekule. Určení takových linkerů je dobře známo odborníkovi v oboru.

Kromě toho signální sekvence pro molekuly podle tohoto vynálezu se mohou modifikovat ke zvýšení exprese. Jako příklad se uvádí požadovaný fúzovaný protein, jenž obsahuje aminokyselinovou sekvenci z myší sekvence s těžkým řetězcem, který je identický s chimérickým variabilním těžkým řetězcem (V_H) z obr. 2 (SEQ ID č. 4), mající nahrazen původní signální peptid jinou signální sekvencí (aminokyselinové zbytky 1 až 20, SEQ ID č. 6).

Například fúzovaný protein obsahuje peptidovou nebo proteinovou sekvenci s variabilním těžkým a/nebo lehkým řetězcem, která má antigenovou specificitu 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 fúzovaný protein podle tohoto vynálezu je charakterizován aminokyselinovou sekvencí obsahující alespoň jeden a výhodně všechny CDRs z variabilního úseku těžkých a/nebo lehkých řetězců z molekuly 3B9 myší protilátky se

zbývajícími sekvencemi, které jsou odvozeny z lidského zdroje, nebo jeho funkčního fragmentu nebo analogu, viz například humanizované V_H a V_L úseky SEQ ID č. 11 a 12 a SEQ ID č. 13 a 14 (obr. 4 a 5).

Při ještě jiném provedení konstruovaná protilátka podle tohoto vynálezu může být připojena k dalšímu prostředku. Například se může použít způsob rekombinantní DNA technologie k přípravě protilátky podle tohoto vynálezu, kde Fc fragment nebo CH3 doména úplné molekuly protilátky je nahrazena enzymem nebo jinou detekovatelnou molekulou (například polypeptidovou efektorovou nebo reportérovou molekulou).

Druhý partner fúze může být také účinně vázán k neimunoglobulinovému peptidu, proteinu nebo jeho fragmentu heterologně k sekvenci obsahující CDR, která má antigenovou specifitu myší 3B9. Výsledný protein může projevovat jak anti-IL4 antigenovou specifitu, tak charakteristiky neimunoglobulinu po expresi. Tato charakteristika partnera fúze může být například funkční charakteristikou, stejně jako jinou vázací nebo receptorovou doménou nebo terapeutickou charakteristikou, pokud fúzovaným partnerem je sám terapeutický protein, nebo dodatkovou antigenovou charakteristikou.

Jiný žádoucí protein podle tohoto vynálezu může zahrnovat úplnou molekulu protilátky, která má plnou délku těžkých nebo lehkých řetězců, nebo nějaký svůj oddělený fragment, jako jsou fragmenty Fab nebo $F(ab')_2$, dimer těžkého řetězce nebo jejich libovolné minimální rekombinantní fragmenty, jako je Fv nebo protilátka s jedním řetězcem (SCA) nebo nějaká jiná molekula se stejnou specificitou jako má

zvolený donor MAb, například MAb 3B9 nebo 6A1. Takový protein se může používat ve formě fúzovaného proteinu nebo se může používat ve formě nefúzované.

Kdykoli je druhý partner fúze odvozen od jiné protilátky, například jde o nějaký isotyp nebo skupinu z úseku imunoglobulinové základní struktury nebo konstantního úseku, výsledkem je konstruovaná protilátka. Konstruované protilátky mohou zahrnovat imunoglobulinové (Ig) konstantní úseky a variabilní úseky základní struktury z jednoho zdroje, například akceptorové protilátky, a jeden nebo větší počet (výhodně všechny) CDRs z donorové protilátky, například anti-IL4 protilátky zde popsané. Kromě toho změny, například delece, substituce nebo adice akceptorové MAb mohou vytvořit úsek lehké a/nebo těžké variabilní domény základní struktury v úrovních nukleové kyseliny nebo aminokyseliny, nebo úseky donorové CDR, za účelem uchování vazebné specificity donorového protilátkového antigenu.

Takové konstruované protilátky jsou určeny, aby použily jeden (nebo oba) variabilní těžké a/nebo lehké řetězce IL4 MAb (popřípadě modifikované jak je popsáno) nebo jeden nebo větší počet z dále identifikovaných CDRs s těžkým nebo lehkým řetězcem (viz příklad 3). Konstruované protilátky podle tohoto vynálezu se neutralizují, to znamená, že se vhodně blokově váží k receptoru IL4 proteinu. Například konstruovaná protilátka odvozená od MAb 3B9 je zaměřena proti zvláštnímu terciárnímu proteinovému epitopu lidského IL4, u kterého se očekává, že je v úseku smyčky B-C —————> C helix, jak je popsáno výše.

Takové konstruované protilátky mohou zahrnovat humanizovanou protilátku obsahující úseky základní struktury

zvoleného lidského imunoglobulinu nebo jeho subtypu nebo chimérickou protilátku obsahující konstantní úseky 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, homologií k nukleotidovým a aminokyselinovým sekvencím donorové protilátky. Lidská protilátka charakterizovaná homologií k úsekům základní struktury donorové protilátky (na aminokyselinové bázi) může být vhodná k poskytnutí konstantního úseku těžkého řetězce a/nebo variabilního úseku základní struktury lehkého řetězce pro inserci donorových CDRs. Vhodná akceptorová protilátka schopná poskytnout konstantní nebo variabilní úseky základní struktury lehkého řetězce se může vybírat podobným způsobem. Mělo by se poznamenat, že akceptorová protilátka s těžkými nebo lehkými řetězci nevyžaduje, aby pocházela ze stejné akceptorové protilátky.

Je žádoucí, aby se heterologní úseky základní struktury a konstantní úseky volily ze tříd a isotypů lidských imunoglobulinů, jako je IgG (subtypy 1 až 4), IgM, IgA a IgE. Avšak akceptorová protilátka nevyžaduje, aby zahrnovala pouze lidské imunoglobulinové proteinové sekvence. Například gen může být konstruován v takové DNA sekvenci, kde kodující část lidského imunoglobulinového řetězce je fúzována k DNA sekvenci kodující ne-imunoglobulinovou aminokyselinovou sekvenci, jako polypeptidová efektorová nebo reportérová molekula.

Jeden z příkladů zvláště vhodné humanizované protilátky obsahuje CDRs 3B9 inserované do úseků základní struktury zvolené lidské protilátkové sekvence. Pro

neutralizaci humanizovaných protilátek se inseruje jeden, dva nebo výhodně tři CDRs z IL4 protilátky s variabilními úseky těžkého řetězce a/nebo lehkého řetězce do úseků základní struktury zvolené lidské protilátkové sekvence, s náhradou přirozených CDRs pozdější protilátky.

Výhodně v humanizované protilátce se variabilní domény jak v lidských těžkých, tak lehkých řetězcích připravují jednou nebo větším počtem náhrad CDR. Je možné použít všech šesti CDRs nebo různých kombinací méně než šesti CDRs. Výhodně se však nahrazuje všech šest CDRs. Je možné nahradit CDRs 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 konstruované protilátky může být odvozen od libovolného vhodného akceptorového lidského imunoglobulinu.

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

Jako jiný příklad se uvádí, že konstruovaná protilátka může obsahovat tři CDRs variabilního úseku lehkého řetězce 3B9 (SEQ ID č. 16, 18, 20 a 28) a tři CDRs variabilního úseku těžkého řetězce 3B9 (SEQ ID č. 22, 24 a 26). Výsledná humanizovaná protilátka je charakterizována antigenovou vazebnou specificitou a vysokou afinitou MAb 3B9.

Odborník v oboru pochopí, že konstruovaná protilátka může být dále modifikována změnami ve variabilní doméně aminokyselin bez nezbytného poskytnutí specifity a vysoké afinity donorové protilátky (to znamená analogu). Například jsou zkonstruovány humanizované monoklonální protilátky, ve kterých aminokyselinový zbytek s lehkým řetězcem v poloze 120 je arginin (SEQ ID č. 13 a 14) nebo threonin (SEQ ID č. 57 a 58). Očekává se, že aminokyseliny s těžkým a lehkým řetězcem mohou být substituovány jinými aminokyselinami buď ve variabilních doménových základních strukturách nebo CDRs nebo v obou.

Kromě toho konstantní úsek může být pozměněn ke zvýšení nebo snížení selektivních vlastností molekul podle tohoto vynálezu, například dimerizací, vázáním k Fc receptorům nebo schopností vázat se 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).

Fúzovaný protein, který je chimérická protilátka, se liší od humanizovaných protilátek popsanych výše tím, že poskytuje celé variabilní úseky s těžkým řetězcem a lehkým řetězcem ne-humanizované donorové protilátky včetně úseků základní struktury, ve spojení s konstantními úseky lidského imunoglobulinu pro oba řetězce. Očekává se, že chimérické protilátky, která udržují další ne-lidské sekvence vzhledem k humanizovaným protilátkám podle tohoto vynálezu mohou vyvolat signifikantní imunitní odezvu u lidí.

Takové protilátky jsou vhodné při prevenci a ošetřování alergických chorob zprostředkovaných IL4, jak je

rozebráno dále.

VI. Způsob přípravy fúzovaných proteinů a konstruovaných protilátek

Výhodně sekvence s variabilním lehkým a/nebo těžkým řetězcem a CDRs MAb 3B9 (SEQ ID č. 16, 18, 20, 22, 24 a 26) nebo jiné vhodné donorové MAb (například 6A1) a jejich kodující sekvence nukleových kyselin se používají při konstrukci fúzovaných proteinů a konstruovaných protilátek, výhodně humanizovaných protilátek podle tohoto vynálezu, za použití dále uvedeného způsobu. Stejně nebo podobné technické postupy se mohou také používat k vytváření jiných ztělesnění tohoto vynálezu.

Hybridom produkující zvolený donorový MAb, například myší protilátku 3B9, se běžně klonuje, a DNA ve svém variabilním úseku těžkého a lehkého řetězce se získá technickými postupy známými odborníkovi v oboru, například technickými postupy, které popsal Sambrook a kol., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory /1989/. Variabilní těžké a lehké úseky 3B9 obsahující alespoň CDRs a části akceptorové MAb lehkého a/nebo těžkého variabilního doménového úseku základní struktury, vyžadované za účelem dosažení donorové MAb vazebné specificity, stejně jako zbývající části odvozené od imunoglobulinu z řetězce protilátky odvozeného od lidského imunoglobulinu, se dostanou za použití polynukleotidových primerů a reversní transkriptasy. CDRs se rozpoznají za použití známé databáze a porovnáním s jinými protilátkami.

Myší/lidská chimérická protilátka se může potom připravit a testovat na schopnost vázání. Taková chimérická

protilátka obsahuje celé V_H a V_L úseky ne-lidské donorové protilátky, ve spojení s konstantními úseky lidského imunoglobulinu pro oba řetězce.

Homologní úseky základní struktury variabilního úseku těžkého řetězce z lidské protilátky se rozpoznají za použití počítačových databází, například KABAT^(R), a lidská protilátka projevující homologii k 3B9 se vybere jako akceptorová protilátka. Sekvence variabilních úseků syntetického těžkého řetězce obsahující 3B9 CDRs se základní strukturou lidské protilátky jsou určeny k účinným náhradám nukleotidů v úsecích základní struktury pro vnesení restričních míst. Takto určené sekvence se potom syntetizují překrývajícími se oligonukleotidy, zesílí reakcí polymerasového řetězce (PCR) a zbaví chyb.

Vhodné variabilní úseky základní struktury lehkého řetězce se navrhuji podobným způsobem.

Humanizovaná protilátka se může odvodit od chimérické protilátky nebo výhodně připravit synteticky inserováním donorových MAb CDRs z přiměřeně těžkých a lehkých řetězců do zvolené základní struktury těžkého a lehkého řetězce. Podle jiného provedení se humanizovaná protilátka podle tohoto vynálezu může připravit za použití obvyklých mutagenních technických postupů. Tak výsledná humanizovaná protilátka obsahuje úseky lidské základní struktury a donorové MAb CDRs. Zde se mohou provést následné manipulace se zbytky základní struktury. Výsledná humanizovaná protilátka může být exprimována do rekombinantních hostitelových buněk, 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 účelně IL4

specifických neutralizujících ne-humanizovaných protilátkách s vysokým titrem.

Běžný expresní vektor nebo rekombinantní plasmid se připravuje umístěním těchto kodujících sekvencí pro fúzovaný protein do účinného spojení s obvyklými regulačními kontrolními sekvencemi schopnými řízení replikace a exprese v hostitelově buňce a/nebo sekrece z hostitelovy buňky. Regulační sekvence zahrnují promotorové sekvence, například CMV promotor, a signální sekvence, které mohou být odvozeny od jiných známých protilátek. Podobně druhý expresní vektor se připravuje tak, že má DNA sekvenci, která koduje komplementární protilátku s lehkým nebo těžkým řetězcem. Výhodně tento druhý expresní vektor je identický s prvním, s tou výjimkou, že kodující sekvence a volitelné signální znaky jsou koncentrovány tak, že zajišťují jak jen je možno, aby každý polypeptidový řetězec byl funkčně exprimovaný.

Zvolená hostitelská buňka se kotransfekuje obvyklými technickými postupy jak s prvními, tak s druhými vektory nebo se jednoduše transfekuje jediným vektorem, aby se vytvořila transfekovaná hostitelská buňka podle tohoto vynálezu zahrnující jak rekombinantní, tak syntetické lehké a těžké řetězce. Transfekovaná buňka se potom kultivuje obvyklými technickými způsoby za vzniku konstruované protilátky podle tohoto vynálezu. Humanizovaná protilátka, která zahrnuje spojení jak rekombinantního těžkého řetězce, tak lehkého řetězce se vyšetří z kultury vhodným testem, jako je ELISA nebo RIA. Podobné běžné technické postupy se mohou použít ke konstrukci jiných fúzovaných proteinů a molekul podle tohoto vynálezu.

Vhodné vektory pro klonovací a subklonovací stupně

používané při způsobech a konstrukci prostředků podle tohoto vynálezu může zvolit odborník v oboru. Například se mohou použít obvyklé pUC řady klonovacích vektorů. Jedním z používaných vektorů je pUC19, který je komerčně dostupný od dodavatele, jako je Amersham (Buckinghamshire, Spojené Království) nebo Pharmacia (Uppsala, Švédsko), Kromě toho libovolný vektor, který je schopen se snadno replikovat, má nadbytek klonovacích míst a geny signálního znaku, dá se s ním snadno manipulovat a může být použit pro klonování. Tak výběr klonovacího vektoru není omezující činitel podle tohoto vynálezu.

Podobně vektory použité pro expresi konstruovaných protilátek podle tohoto vynálezu může vybrat odborník z oboru z libovolných obvyklých vektorů. Vektory také obsahují zvolené regulační sekvence, které jsou účinně spojené s DNA kodujícími sekvencemi imunoglobulinových úseků a jsou schopné řídit replikaci a expresi heterologních sekvencí DNA ve zvolených hostitelových buňkách, tak jako CMV promotory. Tyto vektory obsahují výše popsané DNA sekvence, které kodují pro konstruovanou protilátku nebo fúзованou molekulu. Podle jiného provedení vektory mohou vpravit zvolené imunoglobulinové sekvence modifikované insercí žádoucích restričních míst pro snadnou manipulaci.

Expresní vektory mohou být také charakterizovány geny signálního znaku vhodnými pro zesílenou expresi heterologních DNA sekvencí, například genem savčí dihydrofoliát reduktasy (DNFR) nebo neomycinovým resistenčním genem (neo^R). Jiné výhodné vektorové sekvence zahrnují poly A signální sekvenci, jako z hovězího růstového hormonu (BGH) a β -globinovou promotorovou sekvenci (betaglopro). Expresní vektory vhodné podle zde popsaného řešení se mohou syntetizovat technickými

způsoby dobře známými odborníky v oboru.

Složky takových vektorů, například replikony, selekční geny, zesilovače transkripce, promotory, signální sekvence a podobně, se mohou dostat z přírodních zdrojů nebo připravit synteticky známými postupy pro použití v řízené expresi a/nebo sekreci produktu z rekombinantní DNA ve zvoleném hostiteli. Jiné vhodné expresní vektory takového počtu typů, které jsou známy v oboru pro expresi v svacích, bakteriích, hmyzu, kvasinkách a houbách, se mohou také zvolit pro tento účel.

Tento vynález také zahrnuje buněčnou linii transfekovanou s rekombinantním plasmidem obsahujícím kodující sekvence konstruovaných protilátek nebo jejich fúzovaných molekul. Hostitelské buňky vhodné pro klonování a jiné manipulace s těmito klonujícími vektory jsou také obvyklé. Avšak nejvhodnější je, pokud se použijí buňky z různých kmenů *E. coli* pro replikaci klonujících vektorů a jiných stupňů při konstrukci fúzovaných proteinů podle tohoto vynálezu.

Vhodné hostitelské buňky nebo buněčné linie pro expresi konstruované protilátky nebo fúzovaného proteinu podle tohoto vynálezu jsou výhodně eukaryotické buňky, jako je mimo jiné CHO, COS, fibroblastová buňka (například 3T3) a myeloidové buňky mezi jinými, přičemž nejvýhodnější je savčí buňka, jako CHO nebo myeloidová buňka. Mohou se používat lidské buňky, co umožňuje, aby molekula byla modifikována podle lidských glykosylačních vzorů. Alternativně se mohou používat jiné eukaryotické buněčné linie. Výběr vhodných savčích hostitelských buněk a způsoby transformace, kultivace, zvětšení, vyšetření a přípravy

produktu a jeho čištění jsou známy v oboru, viz například Sambrook a kol., cit. výše.

Bakteriální buňky se mohou ukázat vhodné jako hostitelské buňky pro expresi rekombinantních MABs podle tohoto vynálezu. Avšak v důsledku sklonu proteinů exprimovaných v bakteriálních buňkách být v nevlásečkové nebo nevhodně vlásečkové formě nebo v neglykosylované formě, libovolný rekombinantní MAb produkovaný v bakteriální buňce by mohl být vyšetřen na retenci antigenové vazebné schopnosti. Pokud molekula exprimovaná bakteriální buňkou se připravuje v nějaké vlásečkové formě, žádoucím hostitelem by měla být bakteriální buňka. Například různé kmeny *E. coli* používané pro expresi jsou dobře známy jako hostitelské buňky v oblasti biotechnologií. Různé kmeny *B. subtilis*, *Streptomyces*, jiné bacily a podobně se mohou také použít při tomto způsobu.

Pokud je to žádoucí, kmeny kvasinkových buněk známé odborníkovi v oboru jsou 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).

Obecné způsoby, kterými se mohou konstruovat vektory podle tohoto vynálezu, transfekční metody vyžadované pro přípravu hostitelských buněk podle tohoto vynálezu a metody kultivace potřebné pro přípravu fúzovaného proteinu nebo konstruované protilátky podle tohoto vynálezu z takové hostitelské buňky jsou vždy obvyklými technickými postupy. Podobně jednou připravené fúzované proteiny nebo konstruované protilátky podle tohoto vynálezu se mohou čistit od obsahu

buněčné kultury obvyklými způsoby v oboru, včetně srážení síranem amonným, na afinitních kolonách, sloupcovou chromatografií, gelovou elektroforézou a podobně. Takové technické postupy jsou známy odborníkovi v oboru a nejsou omezením tohoto vynálezu.

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

Konstruovaná protilátka, jednou podrobena expresi požadovaným způsobem, se potom zkouší na aktivitu in vitro za použití vhodného testu. V současnosti obvyklé testy ELISA se používají pro stanovení kvalitativního a kvantitativního vázání konstruované protilátky k IL4 epitopu. Kromě toho jiné testy in vitro, například BIAcore (Pharmacia), se mohou také používat k ověření neutralizující účinnosti před následujícími klinickými studiemi prováděnými na lidech, což dovoluje ohodnotit stabilitu konstruované protilátky v těle navzdory obvyklým mechanismům clearance.

Podle způsobů popsaných pro humanizované protilátky připravené z 3B9, odborník v oboru může také konstruovat humanizované protilátky z jiných donorů IL4 protilátky, sekvencí variabilních úseků a CDR peptidů zde popsaných. Konstruované protilátky se mohou připravovat s variabilními úseky základní struktury případně označovanými jako "samo" ("self") příjemci konstruované protilátky. Malé modifikace variabilního úseku základních struktur se mohou provádět k dosažení velikého zvýšení antigenového vázání bez

příslušného zvýšení imunogenity pro příjemce. Tak konstruované protilátky mohou účinně ošetřovat stavy zprostředkované IL4 u lidí. Takové protilátky mohou také být vhodné při diagnóze takových stavů.

VII. Terapeutické/profylaktické použití

Tento vynález umožňuje ošetřování a/nebo prevenci alergických stavů u lidí tím, že se takovým lidem podává účinné množství farmaceutického prostředku podle tohoto vynálezu.

Tento vynález se také týká způsobu ošetřování lidí, kteří mají zkušenost s alergickou chorobou. Způsob zahrnuje podávání účinné dávky protilátek včetně jedné nebo většího počtu konstruovaných protilátek nebo fúzovaných proteinů zde popsaných nebo jejich fragmentů.

Terapeutická odezva vyvolaná použitím molekul podle tohoto vynálezu se vytváří vázáním k lidskému IL4 a následným blokováním uvolňovaného IgE. Tak molekuly podle tohoto vynálezu, pokud jsou v přípravcích a prostředcích vhodných pro terapeutické použití, jsou vysoce žádoucí pro osoby s alergickou odezvou, jako je alergická rinitida, konjunktivitida, atopická dermatitida, atopické astma a anafylaktický šok.

Fúzované proteiny, protilátky, konstruované protilátky nebo jejich fragmenty podle tohoto vynálezu se mohou také používat se spojení s jinými protilátkami. Zvláště lidské MAbs reagují s jinými signálními znaky (epitopy) odpovědnými za stav, proti kterému je zaměřena konstruovaná protilátka

podle tohoto vynálezu. Podobně MAbs reaktivní s epitopy odpovědnými za stavy u zvolených zvířat, proti kterým jsou protilátky podle tohoto vynálezu zaměřeny, se mohou také používat se veterinárních prostředcích.

Předpokládá se, že terapeutické prostředky podle

tohoto vynálezu jsou vhodné pro ošetřování 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 rinitida nebo podobné stavy. To představuje žádoucí výhodu oproti v současné době používanému předpisu pro infuzi, kdy se ošetřují choroby zprostředkované IL4 podle dosavadního stavu techniky. Dávka a doba ošetřování se vztahují k relativnímu setrvání molekul podle tohoto vynálezu v oběhu člověka, a mohou být upraveny odborníkem v oboru v závislosti na stavu určeném k ošetřování a obecném zdraví pacienta.

Způsobem podávání terapeutického prostředku podle tohoto vynálezu může být libovolná vhodná cesta, která uvolňuje prostředek v pacientovi. Fúzané proteiny, protilátky, konstruované 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.

Terapeutické prostředky podle tohoto vynálezu se mohou připravovat jako farmaceutické prostředky, které obsahují účinné množství konstruované protilátky (například humanizované protilátky) podle tohoto vynálezu jako účinnou látku ve farmaceuticky přijatelné nosné látce. V profylaktickém prostředku podle tohoto vynálezu je vodná suspenze nebo roztok obsahující konstruovanou protilátku, účelně pufrovaný na fyziologickou hodnotu pH, výhodně ve formě připravené pro injekce. Prostředky pro parenterální podání budou obvykle obsahovat roztok konstruované protilátky podle tohoto vynálezu nebo její směs, rozpuštěné ve farmaceuticky přijatelné nosné látce, výhodně ve vodné nosné látce. Mohou se používat obměny vodné nosné látky, 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 vyžadovány za přibližně fyziologických stavů, jako látky k úpravě hodnoty pH, pufovací 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 zvláštního způsobu zvoleného podávání.

Tak farmaceutický prostředek podle tohoto vynálezu pro intramuskulární injekci se může připravit tak, že má objem 1 ml sterilní pufované vody a obsah od přibližně 1 ng do zhruba 100 mg, například od přibližně 50 ng do zhruba 30 mg nebo více, výhodně od přibližně 5 mg do zhruba 25 mg konstruované protilátky podle tohoto vynálezu. Podobně farmaceutický prostředek podle tohoto 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 konstruované protilátky podle tohoto vynálezu. Aktuální metody pro přípravu prostředků podávaných parenterálně jsou dobře známy nebo budou zřejmé odborníkovi v oboru a jsou podrobněji popsány například v Remington's Pharmaceutical Science, 15. vyd., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA.

Je výhodné, když terapeutický prostředek podle tohoto vynálezu, pokud je ve formě farmaceutického prostředku, je přítomen ve formě dávkových jednotek. Příslušnou terapeuticky

účinnou dávku může snadno stanovit odborník v oboru. K účinnému ošetřování zánětlivých chorob u lidí nebo jiných živočichů se má v jedné dávce podat od přibližně 0,1 do zhruba 20 mg proteinu nebo 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 ošetřujícímu lékaři, během zánětlivé odezvy.

Tento vynález také zahrnuje podávání IL4 fúzovaných proteinů podle tohoto vynálezu souběžně nebo postupně s jinými protilátkami nebo fúzovanými proteiny vyznačenými anti-IL4 aktivitou, jako antitumorovou aktivitou s nekrotickým faktorem nebo jinými farmaceutickými aktivitami srovnatelnými s vazebnou schopností IL4 receptoru u fúzovaných proteinů podle tohoto vynálezu. Takové jiné protilátky jsou dostupné komerčně nebo mohou být navrženy způsobem, který je podobný jako je zde popsáno.

Fúzované proteiny a konstruované protilátky podle tohoto vynálezu se mohou také používat v diagnostických režimech, jako pro stanovení chorob zprostředkovaných IL4 nebo pro postup ošetřování takových chorob. Jako diagnostické reagentie se tyto fúzované proteiny mohou běžně značit pro použití v soupravě ELISA nebo jiných obvyklých soupravách pro testování úrovní IL4 v seru, plasmě nebo jiné vhodné tkáni. Povaha testu, při kterém se používají fúzované proteiny, je obvyklá a není omezením tohoto vynálezu.

Protilátky, konstruované protilátky nebo jejich fragmenty zde popsané se mohou lyofilizovat pro skladování a mohou se rekonstituovat ve vhodné nosné látce před použitím. Tento technický postup se ukázal být účinným u obvyklých imunoglobulinů. Mohou se používat v oboru známé

lyofilizační a rekonstituční technické způsoby.

Příklady provedení vynálezu

Dále uvedené příklady ilustrují různé aspekty tohoto vynálezu, včetně konstrukce příkladně uvedených konstruovaných protilátek a jejich exprese ve vhodných vektorech a hostitelských buňkách, a nejsou zamýšleny jako omezení rozsahu tohoto vynálezu. Všechny aminokyseliny se poznají podle obvyklých tří písmenových kódů nebo kódů vyjádřených jediným písmenem. Všechny nezbytné restriční enzymy, plasmidy a jiné reagencie a materiály se získávají z komerčních zdrojů, pokud není uvedeno jinak. Všechny obecně klonující ligace a další rekombinantní DNA metodologie se provádějí jak uvedl T. Maniatis a kol., cit. výše nebo jak popisuje v druhém vydání /1989/ Sambrook a kol., stejný vydavatel ("Sambrook et al.").

Příklad 1

Způsob přípravy MAb 3B9

A. Způsob imunizační procedury

Čtyři myši (F1 hybridy Balb/c a C57BL/6) se imunizují subkutánně 50 μ g rekombinantní E. coli lidského IL4 ve Freundově kompletním adjuvans a o 4 týdny později zesílí intraperitoneálně (i.p.) 50 μ g IL4 ve Freundově nekompletním adjuvans. Na základě dobrého titru serové protilátky k IL4 jedna myš obdrží další imunizace 200 μ g IL4 (i.p. ve fyziologickém roztoku) za 8 týdnů, o 2 dny později 100 μ g IL4 (i.p. ve fyziologickém roztoku) a o 2 dny později 50 μ g 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 (normalizovaným 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 popsanych dále, pro vázání IL4. Positivní 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 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{l/jamka}$, 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 blokuje 1% hovězím serovým 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 puforem (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 μ l zkušebního pufru (0,5 % hovězího γ -globulinu v TBS pufru) a desky se inkubují za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 60 minut. 100 μ l biotinylované anti-myší protilátky se přidá na jamku ve zkušebním pufru a inkubuje jako je popsáno výše. Na jamku se potom přidá 100 μ l alkalickou fosfatasou konjugovaného streptavidinu a inkubuje (za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut). Nato se přidá 100 μ l/jamka PNP substrátu a vše se inkubuje za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Odečtení se provede při optické hustotě 405 nm.

Pro experiment 2 se desky povlečené streptavidinem (100 μ l/jamka, 1 μ g/ml, ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS)) inkubují za teploty 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C po dobu 60 minut). Po tomto a každém z následujících kroků se desky promyjí čtyřikrát puftrem. Potom se přidá 50 μ l biotinylovaného IL4 s 50 μ l zkušebního pufru a vše inkubuje za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Potom se přidá 50 μ l čištěného 3B9 IgG nebo fragmentu Fab (nebo hybridomového prostředí) a 50 μ l zkušebního pufru a vše se inkubuje za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 60 minut. Potom se přidá 100 μ l anti-myšího IgG alkalického fosfatasového konjugátu a inkubuje se za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 60 minut. Nato se přidá 100 μ l PNP substrátu a vše se inkubuje za teploty 37 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Odečtení se provede jak je uvedeno výše.

B. Výpočet 3B9 afinity pro IL4

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/:

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

kde

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

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

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).

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 serovým albuminem, po kterém se s 50 μ l 3B9 (100 ng/ml), 25 μ l ne-lidkého IL4 a 25 μ l biotin-IL4 inkubuje za teploty 37 °C po dobu 60 minut, potom promytou streptavinem konjugovanou alkalickou fosfatase a PNP.

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

Příklad 3

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 připraví za použití dále uvedených opatření.

A. Způsob cDNA klonování

cDNA klony se zhotoví z 3B9 těžkých a lehkých řetězců z mRNA vyextrahované z 3B9 hydridomové buněčné linie (příklad 1) za použití soupravy Boehringer Mannheim. Primery specifické buď pro myší pantovou oblast nebo kappa konstantní úsek se použijí pro první provazovou syntézu.

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

5'-CTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3'

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

5'GTACATATGCAAGGCTTACAACCAATC3'.

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

B. Způsob DNA sekvencování.

Myší cDNA klony s 8 těžkými řetězci a 1 lehkým řetězcem z části A uvedené výše se sekvenčují. Výsledky sekvenčování 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 konservovat mezi variabilními úseky těžkého řetězce myši a variabilními úseky lehkého řetězce myši a myšími signálními sekvencemi. CDR aminokyselinové sekvence jsou uvedeny dále.

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 kodovány 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 kodovány SEQ ID č. 15, 17 a 19.

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 kodující DNA z homologně zjištěné aminokyselinové sekvence.

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.

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.

Dané myší 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 syntetizují následujícími překrývajícími oligonukleotidy a zesilují PCR. SEQ ID č. 31 až 37 poskytne 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 SEQ ID č. 34 a SEQ ID č. 35 překlenují báze 134 až 110 a báze 253 až 230. Jakékoli chyby v mapované sekveci, které byly inserovány 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.

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 myšími 3B9 CDRs. Avšak kodující sekvence pro tyto CDRs (SEQ ID č. 54, 55 a 56) se odlišují od myších 3B9 kodujících sekvencí (SEQ ID č. 21, 23 a 25). Výsledný expresní vektor, IL4hzhcl-1-Pcd je znázorněn na obr. 9.

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: 5CTAGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAAC
TGCAAGG 3'

SEQ ID č. 39: CCTTGCAGTTGATGGTGGCCCTCTCGCCAGAGACACAG

SEQ ID č. 40: TCGAGAGGCCTCCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAG
TTATATGAACTGGTATCAGCAGAAACCC

SEQ ID č. 41: GGGTTTCGTGCTGATACCAGTTCATATAACTATCACCATCATA
ATCAACACTTTGGGAGGCCTC

Pro CDR2:

SEQ ID č. 44: GGGCAGCCTCCTAAGTTGCTCATTACGCTGCATCCAATCTA
GAATCTGGGGTAC

SEQ ID č. 45: CCCAGATTCTAGATTGGATGCAGCGTAAATGAGCAACTTAGG
AGGCTGCCC

Pro CDR3:

SEQ ID č. 42: ATACTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCGAGGTTCCG
CGGAGGGAC

SEQ ID č. 43: CTTGGTCCCTCCGCCGAACCTCGGAGGATCCTCATTACTTIG
CTGACAGTAGT

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

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

Humanizovaný těžký řetězec, odvozený od IgG₁ isotypu, 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.

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.

DNA fragmenty obsahující svůj příslušný signál vázaný buď k těžkým nebo lehkým variabilním úsekům se inseruje do expresního plasmidu 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 plasmidů IL4hzhc1-1Pcd (těžký řetězec) (obr. 9) a IL4hzlcl-o-Pcn (lehký řetězec) (obr. 10). HZHC a HZLC plasmidy 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 isotypu IgG4.

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.

Příklad 5

Způsob konstrukce chimérické protilátky

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

5' primer: SEQ ID č. 50:

GTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGC

3' primer: SEQ ID č. 51:

CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACG

Tyto dva fragmenty se ligují do plasmidu pCD (viz obr. 7) (digerováno s EcoRI a ApaI), který již koduje 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.

Protože obvyklá restirkce endonukleasového 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'CAGGTTACCCIGAAAGAGTC3'

SEQ ID č. 49: 3' primer:

5'GAAGTAGTCCTGACCAG 3'

Z tohoto plasmidu 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
GACCCAGGTCTTCATTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGC
AG

SEQ ID č. 47: 3' primer:

GTAACCTGCCCCGTAGGCACCAGAGATCCAGA
GCAACAGAGAAATGAAGACCTGGGTCTGCAACACCATGTTGCTGGCGTC
CTCG

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

[5'CATCTAGATGGCG CCGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC3'

SEQ ID č. 52], použité k fúzi myšího 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.

Prostředí supernatantů se zachytí o tři a pět dní později a testuje se za použití ELISA tímto popsáním 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 peroxidasa křenu selského konjugovaná s kozí protilátkou specifickou pro celou lidskou IgG protilátku. To se provádí přidáním ABTS peroxidasevého 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 kodující pro protilátku specificky pro IL4.

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 ionů a chromatografií na molekulovém síti. Podobný způsob byl úspěšně použit pro čištění jiných MAb (například na respirační syncyliární virus a malariové cirkumsporoziátové

antigeny) na čistotu vyšší než 95 %.

Afinita a podrobná termodynamika IL4 vázajícího se na humanizovanou MAb 3B9 a myši 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 MAb 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 MAb jsou termodynamické hodnoty nerozeznatelné.

Tabulka 1

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

MAb	K _d pikomol	ΔG kJ/ mol IL4	ΔH kJ/ mol IL4	-TΔS 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 kryšího MAb

Mab 6A1, zvolená pro vysokou afinitní vazebnost, je odvozena od imunizované krysy, za použití stejného postupu iminuzace, 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.

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 depositním číslem 93 100 620 a byl přijat jako deponovaný vzorek z důvodů patentování podle Budapeštské úmluvy z roku 1977, nařizující ukládání mikroorganismů pro účely patentového řízení.

Příklad 8

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

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

A. Vázání glykosylovaného rhIL4

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.

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 se stanoví v τ -čítači po oddělení buněk s vázaným ^{125}I -IL4 pomocí odstředování, při použití olejového gradientu. Nespecifické 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 myši (IgG) 3B9 hodnota IC_{50} odpovídá 63 pM a 93 pM pro fragment Fab. Při jiné koncentraci IL4 (218 pM) testem stanovené množství myši (IgG) 3B9 činí 109 pM.

C. Způsob inhibice proliferace lymfocytů

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 tři 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 dobu 3 dnů s IL4 imobilizovaným anti-IgM. Proliferace se měří inkorporací 3H thymidinu.

3B9 (myši) 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 a pro B buněčnou proliferaci činí 103 pM. Odpovídající hodnoty pro Fab fragment 3B9 (myši) jsou 108 a 393 pM.

D. Způsob inhibice CD23 indukce

CD23 je nízko afinitní receptor pro IgE (FcERII) 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 (myší) 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 buněčná 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 (myší) a Fab fragmentem 3B9 v přítomnosti 1,7 nM IL4, co poskytne 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 (myší). Molární poměr protilátky (IgG) k IL4 zůstává nezměněn (1:1) ve zkoušených koncentračních rozmezích.

F. Shrnutí a interpretace hodnot

Molární poměry IL4 k různým MAb, vyžadované pro 50% inhibiční 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			
	Myší 3B9	Myší 3B9 (Fab)	Kryší 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, myší 3B9 a 6A1 ve dvou testech proliferace

lymfocytů, ale vyšší pro humanizovaný 3B9 při testu indukce CD23, což 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.

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 specifické.

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

Příklad 9

Farmakokinetické údaje

Farmakokinetika humanizované 3B9 se stanovuje u samčích krys 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 plasmě 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.

Výsledky z této studie jsou shrnuty do tabulky 3.

Tabulka 3

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

Zkratka farmakokinetického parametru:

Clp znamená zdánlivá clearance plasmy

Údaje ukazují, že interanimální variabilita je relativně malá a vymizení humanizované 3B9 z plasmy se zdá být dvojfázové. Zdánlivá clearance plasmy je nízká (0,5 ml/h/kg). Poločas života se zdá být 11 dnů. Tak farmakokinetické charakteristiky humanizované 3B9 odvozené od CHO buněk jsou konsistentní s jinými humanizovanými monoklonálními protilátkami u krys. 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.

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

Seznam sekvencí

1) Obecné informace

i) Přihlašovatel:

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

ii) Název vynálezu: Rekombinantní IL4 protilátky
použitelné pro ošetřování chorob zprostředkova-
ných IL4

iii) Počet sekvencí: 58

iv) Adresa pro korespondenci:

- a) Adresát: SmithKline Beecham Corporation
- b) Ulice: Corporate Intellectual Property,
UW2220 - 709 Swedeland Rd.
- c) Město: King of Purssia
- d) Stát: PA
- e) Země: USA
- f) PSČ (ZIP): 19406-2799

v) Počítačová čtecí forma:

- a) Typ media: Floppy disk
- b) Počítač: IBM PC kompatibilní
- c) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
- d) Software: PatentIn Release # 1.0,
Verze # 1,25

vi) Prioritní údaje přihlášky:

- a) Číslo přihlášky: US 08/117 366
- b) Datum podání: 7. září 1993

c) Zatřídění:

a) Číslo přihlášky: US 08/136 783

b) Datum podání: 14. října 1993

c) Zatřídění:

viii) Informace o zástupci:

a) Jméno: Jeffrey A. Sutton

b) Registrační číslo: 34 028

c) Číslo spisu: P50186-2

ix) Telekomunikační informace:

a) Telefon: (215)270 50 24

b) Telefax: (215)270 50 90

2) Informace pro SEQ ID č. 1:

i) Charakteristiky sekvence:

a) Délka: 396 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..396

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 1:

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

2) Informace pro SEQ ID č. 2:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: protein

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

2) Informace pro SEQ ID č. 4:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 57 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..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	

2) Informace pro SEQ ID č. 8:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: protein

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	

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	

2) Informace pro SEQ ID č. 10:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: protein

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:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 423 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..423

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 11:

```
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 CGT GAA TCC GGT CCG GCA CTA GTT      96
Gly Ala Tyr Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val
          20              25              30

AAA CCG ACC CAG ACC CTG ACG TTA ACC TGC ACC TTC TCC GGT TTC TCC      144
Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser
  35              40              45

CTG TCG ACC TCC GGT ATG GGT GTT TCC TGG ATC CGT CAG CCG CCG GGT      192
Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
  50              55              60

AAA GGT CTA GAA TGG CTG GCT CAC ATC TAC TGG GAC GAC GAC AAA CGT      240
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
  65              70              75              80

TAC AAC CCG AGC CTG AAA TCC CGT CTG ACG ATA TCC AAA GAC ACC TCC      288
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
          85              90              95
```

CGT AAC CAG GTT GTT CTG ACC ATG ACT AAC ATG GAC CCG GTT GAC ACC	336
Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr	
100 105 110	
GCT ACC TAC TAC TGC GCT CGA CGC GAA ACC GTT 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	
GAC GTT TGG GGT CGT GGT ACC CCA GTT ACC GTG AGC TCA	423
Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

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:

- a) Délka: 393 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..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:

- a) Délka: 45 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..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
```

2) Informace pro SEQ ID č. 16:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: protein

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:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 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:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 18:

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

2) Informace pro SEQ ID č. 19:

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. 19:

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

27

2) Informace pro SEQ ID č. 20:

i) Charakteristiky sekvence:

- 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
```

2) Informace pro SEQ ID č. 21:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: cDNA

ix) Rysy:

- 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

2) Informace pro SEQ ID č. 22:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 22:

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
1 5

2) Informace pro SEQ ID č. 23:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 48 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..48

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 23:

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

48

2) Informace pro SEQ ID č. 24:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 16 aminokyselin
- b) Typ: aminokyselina
- d) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: protein

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:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 33 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..33

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 25:

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

33

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 TTCCTGTGA AGCTCTGAC 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:

GGTTACCCTG CGTGAATCCG GTCGGGCACT AGTTAAACCG ACCCAGACCC TGACGTTAAC 60
CTGCACCTTC TCCGGTTTCT CCGTGTGAC CTCGGTATG GGTGTTTCCG GGATCCG 117

2) Informace pro SEQ ID č. 32:

i) Charakteristiky sekvence:

- 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:

TCAGCCGCCG GGTAAGGTC TAGAATGGCT GGCTCACATC TACTGGGACG ACGACAAACG 60
TTACAACCCG AGCCTGAAAT CCGTCTGAC GATATCCAAA GACACCTCCC GTAACCAGGT 120

2) Informace pro SEQ ID č. 33:

i) Charakteristiky sekvence:

- 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
TTTCTACTGG TACTTCGACG TTTGGGGTCC TGGTACCCCA GTTACCGTGA GCTCCCAACC 120

2) Informace pro SEQ ID č. 34:

i) Charakteristiky sekvence:

- 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:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 24 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 35:

ATGGTCAGAA CAACCTGGTT ACGG

24

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 36:

TTCGGGTAC CCTGCGTGAA TCCGG

25

2) Informace pro SEQ ID č. 37:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 21 pár bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný
- d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 37:

CCAACCCCTCG AGTGCCATTG A

21

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 38:

CTAGCTGTGT CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGG

43

2) Informace pro SEQ ID č. 39:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 39:

CCTTGCCAGTT GATGGTGGCC CTCTGCCCCA GAGACACAG

39

2) Informace pro SEQ ID č. 40:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 40:

TCGAGAGGCC TCCCAAAGTG TTGATTATGA TGGTGATAGT TATATGAACT GGTATCAGCA

60

GAAACCC

67

2) Informace pro SEQ ID č. 41:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 41:

```
GGGTTTCTGC TGATACCAGT TCAATAACT ATCACCATCA TAATCAACAC TTTGGGAGGC 60
CTC 63
```

2) Informace pro SEQ ID č. 42:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 42:

```
ATACTACTGT CAGCAAAGTA ATGAGGATCC TCCGAGGTC GGCGGAGGGA C 51
```

2) Informace pro SEQ ID č. 43:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 53 párů bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný

d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 43:

CTGGTCCCT CCGCCGAACC TCGGAGGATC CTCATTACTT TCGTGACAGT AGT

53

2) Informace pro SEQ ID č. 44:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 44:

GGGCAGCCTC CTAAGTTGCT CATTACGCT GCATCCAATC TAGAATCTGG GGTAC

55

2) Informace pro SEQ ID č. 45:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 45:

CCCAGATTCT AGATTGGATG CAGCGTAAAT GAGCAACTTA GGAGGCTGCC C

51

2) Informace pro SEQ ID č. 46:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 46:

AATTCGAGGA CGCCAGCAAC ATGGTGTTC AGACCCAGGT CTCATTCTCT CTGTTGCTCT

60

GGATCTCTGG TGCCTACGGG CAG

83

2) Informace pro SEQ ID č. 47:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 47:

GTAACCTGCC CGTAGGCACC AGAGATCCAG AGCAACAGAG AATGAAGAC CTGGGTCTGC

60

AACACCATGT TGCTGGCGTC CTCG

84

2) Informace pro SEQ ID č. 48:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 48:

CAGGTTACCC TGAAGAGTC

20

2) Informace pro SEQ ID č. 49:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 49:

GAAGTAGTCC TTGACCAG

18

2) Informace pro SEQ ID č. 50:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 31 pár bází
- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: jediný

d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 50:

GTCACCGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGG C

31

2) Informace pro SEQ ID č. 51:

i) Charakteristiky sekvence:

a) Délka: 22 párů bází

b) Typ: nukleová kyselina

c) Řetězec: jediný

d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 51:

CTTGGTGCTA GCTGAGGAGA CG

22

2) Informace pro SEQ ID č. 52:

i) Charakteristiky sekvence:

a) Délka: 47 párů bází

b) Typ: nukleová kyselina

c) Řetězec: jediný

d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 52:

CATCTAGATG GGGCCGCCAC AGTACGTTTG ATCTCCAGCT TGGTCCC

47

2) Informace pro SEQ ID č. 53:

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

ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 53:

AAGGCCTCCC AAAGTGTGA TTATGATGGT GATAGTTATA TGAAC

45

2) Informace pro SEQ ID č. 54:

- i) Charakteristiky sekvence:
 - a) Délka: 21 pár bází
 - b) Typ: nukleová kyselina
 - c) Řetězec: dvojitý
 - d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 54:

ACCTCCGGTA TGGGTGTTTC C

21

2) Informace pro SEQ ID č. 55:

- i) Charakteristiky sekvence:
 - a) Délka: 48 párů bází

- b) Typ: nukleová kyselina
- c) Řetězec: dvojitý
- d) Topologie: neznámá

ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 55:

CACATCTACT GGGACGACGA CAAACGTTAC AACCCGAGCC TGAAATCC

48

2) Informace pro SEQ ID č. 56:

i) Charakteristiky sekvence:

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

ii) Typ molekuly: cDNA

xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 56:

CGCGAAACCG TTTTCTACTG GTACTTCGAC GTT

33

2) Informace pro SEQ ID č. 57:

i) Charakteristiky sekvence:

- a) Délka: 393 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..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 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu	
115 120 125	
ATC AAA CGT	393
Ile Lys Arg	
130	

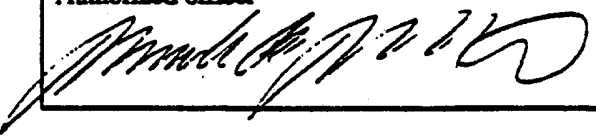
2) Informace pro SEQ ID č. 58:

Applicant's or agent's file reference number P50186-2	International Application No. PCT/US91/10308
--	---

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 32, line 14.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)	
Address of depositary institution (including postal code and country) Porton Down Salisbury Wiltshire, SP4 0JG United Kingdom	
Date of Deposit 06 October 1993	Accession Number 93100620
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations in which a European or Australian Patent is sought or in any other states having equivalent provisions, a sample of the deposited micro-organism will be made available until the publication of the mention of the grant of the patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) All	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications, e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer 	Authorized officer

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Fúzovaný protein s vazebnou specificitou^o pro lidský interleukin-4 (IL4), který zahrnuje komplementární determinující úseky (CDRs) odvozené od ne-lidských neutralizujících monoklonálních protilátek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že disociační konstanta je rovna nebo menší než 2×10^{-10} M pro lidský IL4 a první partner fúze.
2. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je účinně vázán k druhému partneru fúze.
3. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že ne-lidská neutralizující monoklonální protilátka je vybrána ze souboru sestávajícího z 3B9 a 6A1.
4. Fúzovaný protein podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že druhý partner fúze zahrnuje celý nebo část imunoglobulinového konstantního těžkého řetězce nebo imunoglobulinového konstantního lehkého řetězce nebo oba.
5. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence prvního partnera fúze je sekvence těžkého řetězce z aminokyselin 21 až 50, 56 až 71, 88 až 119 a 131 až 141 SEQ ID č. 12.
6. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence prvního partnera fúze je sekvence lehkého řetězce z aminokyselin 20 až 42, 58 až 72, 80 až 111 a 121 až 131 SEQ ID č. 14.

7. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m, že aminokyselinové sekvence komplemen-
tárních determinujících úseků pro těžký řetězec jsou

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

8. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m, že aminokyselinové sekvence komplemen-
tárních determinujících úseků pro lehký řetězec jsou

- a) LeuAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsn: SEQ
ID č. 16,
- b) AlaAlaSerAsnLeuGluSer: SEQ ID č. 18 nebo
- c) GlnGlnSerAsnGluAspProProArg: SEQ ID č. 28.

9. Fúzovaný protein podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m, že aminokyselinové sekvence komplemen-
tárních determinujících úseků pro lehký řetězec jsou

- a) LysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsn: SEQ
ID č. 16,
- b) AlaAlaSerAsnLeuGluSer: SEQ ID č. 18 nebo
- c) GlnGlnSerAsnGluAspProProThr: SEQ ID č. 20.

10. Komplementární determinující úsek (CDR) imunoglo-
bulinového těžkého řetězce, jehož aminokyselinová sekvence je
vybrána ze souboru sestávajícího z

- a) ThrSerGlyMetGlyValSer: SEQ ID č. 22,

b) HsiIleTyrTrpAspAspAspLysArgTyrAsnProSerLeuLysSer:
SEQ ID č. 24 a

c) ArgGluThrValPheTyrTrpPheAspVal: SEQ ID č. 26.

11. Komplementární determinující úsek (CDR) imunoglobulinového lehkého řetězce, jehož aminokyselinová sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího z

a) LeuAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsn: SEQ
ID č. 16,

b) AlaAlaSerAsnLeuGluSer: SEQ ID č. 18,

c) GlnGlnSerAsnGluAspProProArg: SEQ ID č. 28 a

d) GlnGlnSerAsnGluAspProProThr: SEQ ID č. 20.

12. Molekula nukleové kyseliny kodující komplementární determinující úsek (CDR) imunoglobulinového těžkého řetězce, jehož sekvence je vybrána ze souboru sestávajícího 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.

13. Molekula nukleové kyseliny kodující komplementární determinující úsek (CDR) imunoglobulinového lehkého řetězce, jehož 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,
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.

14. Humanizovaná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 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 úseky komplementárních determinujících úseků každého z těchto řetězců jsou odvozené od ne-lidské neutralizující monoklonální protilátky specifické pro lidský IL4, která je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4.

15. Protilátka podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je účinně vázána k efektorovému prostředku zvolenému ze skupiny sestávající z molekuly neproteinové nosné látky, polystyrenu a plastických kuliček.

16. Chimérická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato protilátka je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4, přičemž aminokyselinové sekvence komplementárních determinujících úseků každého řetězce jsou odvozené od ne-lidské neutralizující monoklonální protilátky specifické pro lidský IL4, která je charakterizována disociační konstantou rovnou

nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M pro lidský IL4.

17. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje fúzovaný protein podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelnou nosnou látku.

18. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je zvolena ze souboru sestávajícího ze

a) sekvence nukleové kyseliny kodující fúzovaný protein podle nároku 1,

b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k a),

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

d) fragment nebo analogu a), b) nebo c), který koduje protein vyznačený tím, že má specificitu pro lidský interleukin-4,

příčemž tato sekvence popřípadě obsahuje restriční místo.

19. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kodující fúzovaný protein zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny z obr. 5, SEQ ID č. 13.

20. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kodující fúzovaný protein zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny z obr.

4, SEQ ID č. 11.

21. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je zvolena ze souboru sestávajícího ze

a) sekvence nukleové kyseliny kodující komplementární determinizující úsek (CDR), kde tento CDR se dostane z neutralizující myší monoklonální protilátky specifické pro lidský interleukin-4, s disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M,

b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k a),

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

d) fragment nebo analogu a), b) nebo c), který koduje protein vyznačený tím, že má specificitu pro lidský interleukin-4.

22. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 21, kde sekvence je vybrána ze souboru sekvencí kodujících těžký řetězec komplementárního determinujícího úseku, 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.

23. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 21, kde sekvence je vybrána ze souboru sekvencí kodujících lehký řetězec komplementárního determinujícího úseku, 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.

24. Rekombinantní plasmid, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 18.

25. Rekombinantní plasmid, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 21.

26. Hostitel^{ska'}ova buňka transfek^tovaná rekombinantním plasmidem podle nároku 24.

27. Hostitel^{ska'}ova buňka transfek^tovaná rekombinantním plasmidem podle nároku 25.

28. Způsob přípravy humanizované protilátky specifické pro lidský interleukin-4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci buněčné linie transfekované

rekombinantním plasmidem podle nároku 24 za řízení vybraných regulačních sekvecí schopných řídit expresi v těchto buňkách.

29. Způsob diagnózy alergií a jiných stavů spojených s nadměrnou produkcí imunoglobulinu E u člověka, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že se vzorek biologické kapaliny uvede do styku s vysokým titrem monoklonální protilátky pro lidský IL4 a stanoví se výskyt vázání mezi uved^enou monoklonální protilátkou a lidským interleukinem-4.

30. Způsob vyšetření monoklonálních protilátek, které mají vysoký titr pro lidský interleukin-4, v y z n a č u - j í c í s e t í m, že se

a) připraví hybridom buněčné linie vyznačené sekrecí monoklonální protilátky do lidského interleukinu-4 a

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

31. Neutralizující monoklonální protilátka, která má vysoký titr pro lidský interleukin-4, fragment Fab nebo jeho fragment $F(ab')_2$, produkovaný vyšetřením sbírky hybridomových produktů s aldehydem kondenzovaným na lidský interleukin-4 nebo biotinylovaný lidský interleukin-4.

32. Neutralizující monoklonální protilátka hlodavců, specifická pro lidský interleukin-4, která má vazebnou afinitu v y z n a č u j í c í s e disociační konstantou rovnou nebo menší než přibližně 2×10^{-10} M.

33. Monoklonální protilátka podle nároku 32,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že hlodavcem je myš.

34. Monoklonální protilátka podle nároku 33, v y -
z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje lehký řetězec
aminokyselinové sekvence SEQ ID č. 2 a těžký řetězec
aminokyselinové sekvence SEQ ID č. 4.

35. Monoklonální protilátka podle nároku 32,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že hlodavcem je krysa.

36. Monoklonální protilátka podle nároku 35,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že má identifikující
charakteristiky 6A1.

37. Hybridom, v y z n a č u j í c í s e t í m, že
má identifikující charakteristiky buněčné linie 3426A11C1B9.

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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile</u>	
120 125 130	
AAA CGG	396
Lys Arg	

Obr. 3

Lidská/myši 3B9 chiméřní 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 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 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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly	
40 45 50	
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG CAG	195
Asp Ser Tyr Met Asn 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 Ala Ala Ser Asn Leu Glu	
70 75	
TCT GGG GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG	273
Ser 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 Gln Gln Ser Asn Glu Asp	
105 110 115	
CCT CCG AGG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA	390
Pro Pro Arg 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												

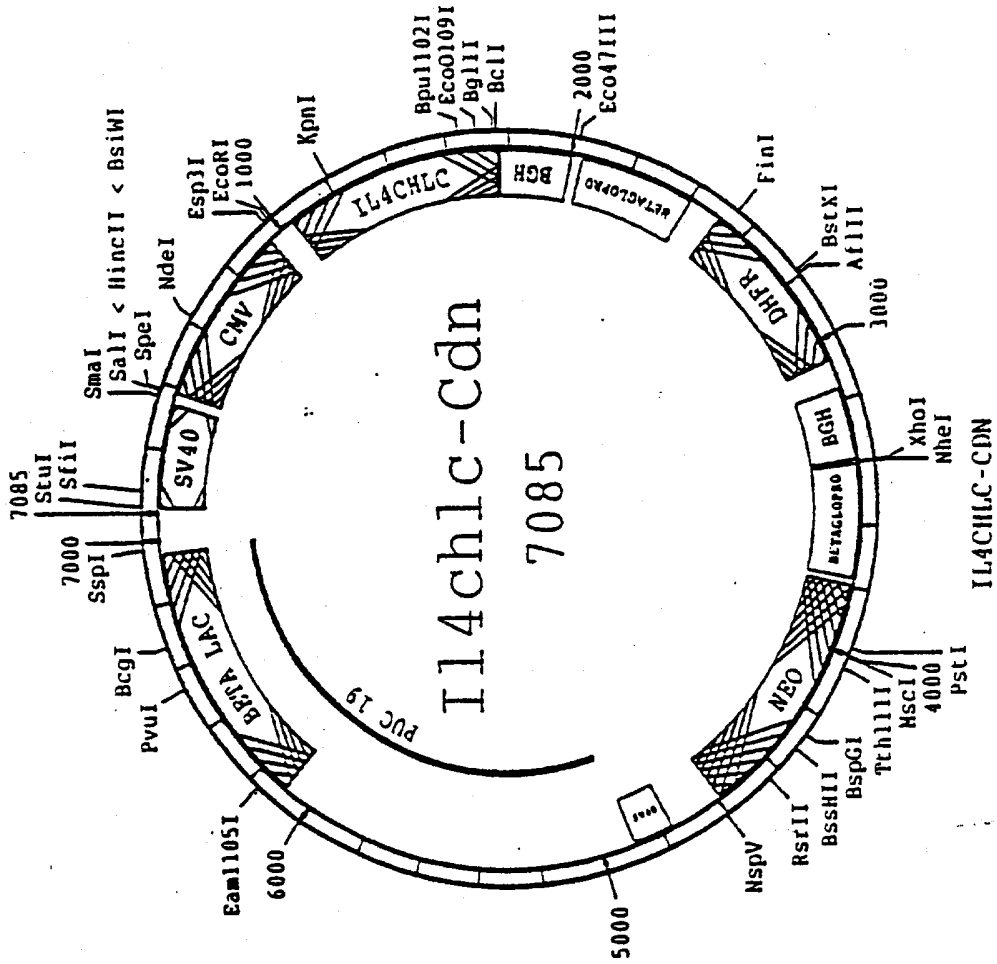
Obr. 6B

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

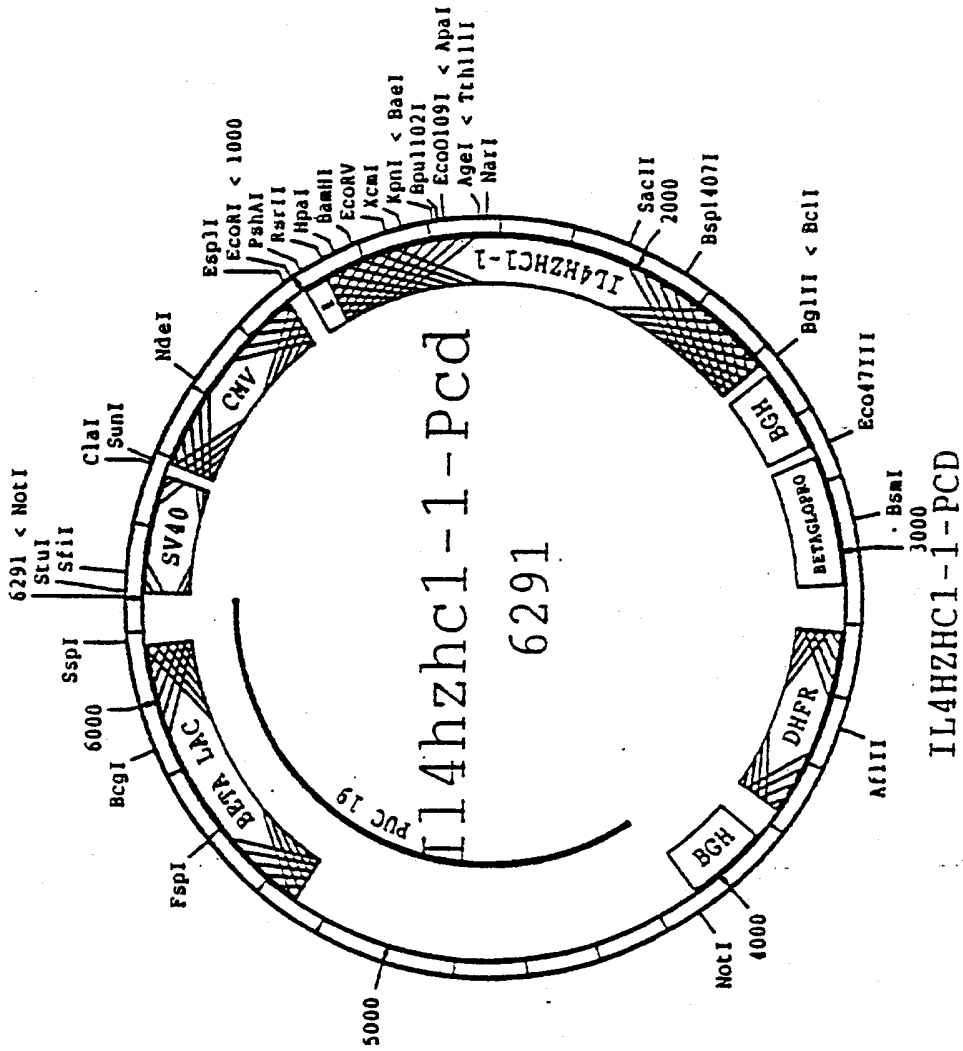
ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	39
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	
1				5					10				

GCT	ACA	GGT	GTC	CAC	TCC	GAT	ATC	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	78
Ala	Thr	Gly	Val	His	Ser	Asp							
	15					20							

Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

