

(19)



(10) **LT 5353 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5353** (51) Int. Cl. (2006): **C07K 16/18**

(21) Paraiškos numeris: **2005 101**

(22) Paraiškos padavimo data: **2005 11 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 03 27**

(45) Patent paskelbimo data: **2006 07 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CU2004/000006**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2004 04 22**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2005 11 21**

(30) Prioritetas: **2003-0092, 2003 04 23, CU**

(72) Išradėjas:

Loudes Tatiana ROQUE NAVARRO, CU
Cristina Maria MATEO DE ACOSTA DEL RIO, CU
Mabel RODRIGUEZ GONZALEZ, CU
Gertrudis ROJAS DORANTES, CU
Ariel TALAVERA PEREZ, CU
Ernesto MORENO FRAIS, CU

(73) Patent savininkas:

CENTRO DE IMMUNOLOGIA MOLECULAR, Calle 216 Esq., 15, Atabey, Playa.,
12100 Ciudad de la Habana, CU

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Rekombinantiniai antikūniai ir jų fragmentai, atpažįstantys N-glikolil-GM3
ganglioizidus, ir jų panaudojimas auglių diagnozei ir gydymui

(57) Referatas:

Šis išradimas iš esmės susijęs su monokloniniais antikūnais, kurie atpažįsta antigenus, turinčius N-glikolil-GM3 ganglioizidus, ir ne kitus N-glikolil arba N-acetil tipo ganglioizidus, arba sulfatų glikolipidus. Konkrečiai šis išradimas susijęs su peptidų sekomis, kurios koduoja rekombinantinius monokloninius antikūnus, gautus iš 14F7 antikūno, kurie atpažįsta N-glikolil-GM3, arba jų fragmentus, gautus iš jų, farmacinės kompozicijas, turinčias minėtus rekombinantinius antikūnus arba jų fragmentus ir jų panaudojimą krūties vėžio ir melanomos diagnozei ir gydymui.

Technikos sritis

Šis išradimas susijęs su imunologijos sritimi ir konkrečiai su gavimu mažiau imunogeniškų imunoglobulinų, naudojamų genų inžinerijos technologijų metodais gydant vėžį. Šis išradimas susijęs su peptidų sekomis, kurios koduoja monokloninius antikūnus arba gaunamus fragmentus, kurie atpažįsta antigenus, turinčius N-glikolil-GM3 gangliozidus ir ne kitus susijusius gangliozidus kaip N-glikolil arba N-acetil, ir taip pat sulfatų glikolipidus.

Išradimo pagrindimas

Gangliozidai yra glikosfingolipidai, kurių sudėtyje yra sialo rūgšties ir jie randami stuburinių plazminėse membranose (Stults CLM ir kt., *Methods Enzymology* 179:167-214, 1989). Apie kai kurias iš šių molekulių literatūroje pranešama kaip apie su augliu susijusius antigenus arba auglio žymenis (Hakamori SH: *Curr Opin Immunol* 3:646-653, 1991), be to, yra aprašytas antigangliozidų antikūnų panaudojimas vėžio diagnozavime ir gydyme. (Houghton AN ir kt., *NAS USA* 82:1242-1246, 1985; Zhang S. ir kt. *Int J Cancer* 73:42-49, 1997). Dažniausiai sialo rūgštys žinduolių ląstelėse yra N-acetil (NAC) ir N-glikolil (NGc). Dažniausiai NGc nėra išreikštos žmogaus ir viščiukų įprastinėse kultūrose, bet yra plačiai paplitę kituose stuburiniuose (Leeden RW ir kt., *Biological Role of Sialic Acid*. Rosenberg A. and Shengtrund CL (Eds). Plenum Press, New York, 1-48, 1976, Kawai T. Rosenberg A. and Shengtrund C.L. (Eds). Plenum Press, New York, 1-48, 1976, Kawai T. Ir kt., *Cancer Research* 51:1242-1246, 2001). Tačiau pranešimai literatūroje rodo, kad anti-NGc antikūnai atpažįsta kai kuriuos žmogaus auglius ir auglių ląstelių linijas (Higashi H. Ir kt., *Jpn J. Cancer Res.* 79:952-956, 1988, Fukui Y. ir kt., *Biochem Biophys Res Commun* 160:1149-1154, 1989). GM3 (NGc) gangliozidų lygio padidėjimas randamas žmogaus krūties vėžio atveju (Marquina G. ir kt., *Cancer Research* 56:5165-5171, 1996), kuris daro labai patrauklų šių molekulių, kaip taikinių, panaudojimą vėžio gydyme. Užregistruotame patente EP 0972782 A1 aprašomas pelės monokloninis antikūnas, pagamintas hibridomos, pagal Budapešto sutartį deponuotos ECACC numeriu 98101901. Šis monokloninis antikūnas turi IgG1 izotipą ir buvo gautas imunizuojant Balb/c peles GcGM3 gangliozidu, hidrofobiškai konjuguotu su žemo tankio lipoproteinais (ŽTL), dalyvaujant Freund'o adjuvantui, minėti antikūnai jungiasi

išskirtinai su NGcGM3 gangliozidais ir atpažįsta antigeną, ekspresuojamą žmogaus krūties ir melanomos auglių. (Carr A. ir kt., Hybridoma 19:3:241-247, 2000). Šie antikūnai rodo stiprų citolitinį aktyvumą ląstelėms, išlaikydami minėtų sekų savybę, galinčią padaryti juos gydymo įrankiu.

Be to, žinoma, kad auglio indukuojama neovaskuliarizacija sudaro vieną iš pagrindinių auglio augimo kontrolės parametrų. Tai nukreipia tyrimą į ieškojimą terapinių ginklų, susijusių su antigeninio proceso inhibicija. Yra eksperimentiniai įrodymai apie 14F7 antikūno efektą į šį reiškinį. Minėti įrodymai buvo surasti matricos gelio analize (Angiogenesis. Vol. 4, Pags. 113-121, 2001; Anti-cancer Res. Vol 18, Pags. 783-790, 1998). Matricos gelis yra bazinės membranos ir ekstraląstelinės matricos, kuri supa endotelio ląsteles, baltymų mišinys. Jo naudingumas neovaskuliarizacijos procesui priklauso nuo fiziologinės endotelio ir matricos tarpusavio sąveikos svarbos naujų kraujotakų formavimosi metu. Taip pat šio gelio komponentai, tokie kaip lamininas yra laikomi svarbiais šio proceso žymenimis.

Šio tipo modelis taip pat buvo naudojamas tiriant mechanizmą, susijusį su auglio indukuota angiogeneze, įgalinančia įvertinti vaistus, sugebančius moduluoti įvykius, tiesiogiai susijusius su augliu, tokiu būdu įtakojant jo augimą ir metastazes.

Ne žmogaus monokloninių antikūnų, tokių kaip pelių 14F7, naudojimas gali būti kliūtimi gydant žmones, dalinai pasikartojančiomis gydymo schemomis. Pavyzdžiui, pelės monokloniniai antikūnai turi santykinai trumpą kraujotakų pusperiodį. Be to, jie netenka svarbios imunologinės savybės, tokios kaip efektorinės funkcijos, jeigu naudojami žmonėms.

Kokia galėtų būti didesnė reikšmė, pelės monokloninių antikūnų, turinčių žymias aminorūgščių sekas, negu imunogeninė, kai jie injekuojami žmogui. Gausūs tyrinėjimai parodė, kad po svetimo antikūno įvedimo gaunamas imuninis atsakas sukuriamas paciente gali būti gana žymus ir iš esmės pašalinti antikūno terapinį efektą po pradinio gydymo. Be to, netgi po pacientams paskirtojo gydymo pelių monokloniniais antikūnais vėlesnis gydymas negiminingais pelėms antikūnais gali būti neefektyvus ir netgi pavojingas, turintis kryžminį atsaką, žinomą kaip HAMA atsakas (Khazaeli M.B. ir kt., Joournal of immunoterapy 15:42-52, 1994).

Mateo ir kt. (US Patent No US 5 712 120) aprašo pelės monokloninių antikūnų imunogeniškumo mažinimo procedūrą. Mateo ir kt. (Mateo C. ir kt., Hybridoma 19:6:463-471, 2000) aprašytu metodu modifikuotas antikūnas išsaugo antigeno atpažinimo ir prisirišimo prie originalaus antikūno sugebėjimą ir tampa mažiau imunogenišku, kas padidina jo gydomąjį naudingumą. Jeigu ši procedūra egzistuočiau su nedideliu skaičiumi mutacijų, modifikuoti antikūnai tada rodytų imunogeniškumo sumažėjimą, palyginus su chimeriniu antikūnu.

Iš to, kas pasakyta aukščiau, daroma išvada, kad egzistuoja versija gavimo terapinių antikūnų, kurie yra mažiau imunogeniški, gaunami paprastu ekonomišku būdu ir kurių rezultatai tolygūs žmonių terapinių kompozicijų gamybai.

Taip pat yra žinomas antikūno fragmentų sėkmingas panaudojimas ligų imunodiagnozei. Ira Pastan tarp kitko aprašo (Europos patento registracija EP0796334 A1) konstravimą Fv tipo vienos grandinės fragmentų, panaudojant antikūnų kintamąją sritį, kuri specifiškai atpažįsta angliavandenius, susijusius su Lewis Y antigenu. Remiantis minėtais fragmentais, autorius išvysto ląstelių, turinčių šiuos antigenus nustatymo būdą ir taip pat pateikia inhibavimo efekto įrodymus, kad šie fragmentai turi ląstelėms, nešančioms antigenus.

14F7 monokloninio antikūno prisirišimo vietos žinojimas yra įdomus praktiniu ir teoriniu požiūriu ir daro šį antigeną potencialiu imunoterapiniam skirtingų ligų gydymui. Souriau, C. ir kt. Expert Opin. Biol. Ther. 1, 845-855, 2001 ir Chester, K.A., ir kt. Dis. Markers. 16, 53-62, 2000, parodė, kad scFv tipo antikūno fragmento panaudojimas gali duoti gerą gydomąjį panaudojimą, teikiant pirmenybę jo farmakologinėms savybėms, tokioms kaip geresnis įsiskverbimas į auglio audinį.

Antikūno fragmentų, esančių filamentiniuose faguose, mini bibliotekų konstravimas iš hibridomų leidžia atrinkti molekules, sugebančias specifiškai atpažinti antigenus šiame arsenale. Tikslas yra greitas gavimas antikūnų fragmentų, kurie jungia atpažinimą originalaus antikūno su mažesne molekuline mase ir gebėjimą būti gautiems iš bakterijų. Ši technika įgalins išryškinti daugybinius variantus antikūnų fragmentų, kurie yra nefunkcionalūs arba neįmanomi produkuoti bakterijose, kurie yra gaunami išskiriant arba veikiant hibridomos kintamos srities genus įprastine klonavimo technika (Roovers, R. C. ir kt., Br. J. Cancer. 78, 1407-1416, 1998).

Antikūnų fragmentų pateikimo filamentiniuose faguose technologija sudaro unikalią galimybę pasiekti antikūnų prisirišimo vietą ir taip pat modifikacijų įvedimą į antikūną, siekiant pagerinti jo giminingumą (Chames, P. ir kt., J. Immunol. 161, 5421-5429, 1998, Lamminmaki, U ir kt., J. Mol. Biol. 291, 589-602, 1999, Parhami-Seren ir kt., J. Immunol. Methods. 259, 43-53, 2002) arba keisti jo specifiškumą (Iba, Y. et. al, Prot. Engn., 11, 361-370, 1998, Miyazaki, C. ir kt., Prot. Engn. 12, 407-415, 1999, Darveau, R.P. ir kt., J. Clin. Immunoassay. 15, 25-29, 1992).

Antikūno fragmentų ekspresija filamentiniuose faguose leidžia apsiukeisti grandinėms (Lantto, J. ir kt., Methods Mol. Biol. 178, 303-316, 2002), būtent deriniui skirtingų VL su originaliomis antikūno VH, arba atvirkščiai, taip leidžiant tirti kiekvienos grandinės vaidmenį, kurį grandinė atlieka atpažįstant antigeną ir jos įtaką giminingumui su antikūnu (Kabat, E.A., Wu, T.T., J. Immunol. 147, 1709-1719, 1991, Barbas III, C. F., Lerner, R. A. Methods: A

companion to Methods in Enzimology 2, 119-124, 1991). Pasikeitimas grandinėmis leidžia modifikuoti prisirišimo vietos ypatybes, taip derinant imunoglobulino sekas iš skirtingų rūšių, parenkant tokius variantus, kurie išsaugo atpažinimo specifiškumą (Klimka, A. ir kt., Br. J. Cancer. 83, 252-260, 2000, Rader, C. ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 8910-8915, 1998, Beiboer, S. W. H. ir kt., J. Mol. Biol. 296, 833-849, 2000).

Šis išradimas skirtas modifikuotiems antikūnams, gautiems iš pelių 14F7 monokloninių antikūnų, kurie atpažįsta originalius antigenus su tuo pačiu giminingumu ir yra mažiau imunogeniški, kai įvedami pacientams. Kita šio išradimo išvada yra gavimas fragmentų, gautų iš minėtų antikūnų, kurie apima lengvosios grandinės kintamąją sritį, skirtingą nuo originalios, bet išlaikančią jos savybes, susijusias su specifiškumu, giminingumu ir atpažinimu ir ekspresuojamų bakterijų-šeimininkių kaip tirpių molekulių, o taip pat esančių ant filamentinių fagų paviršiaus. Fragmentai, gauti iš 14F7 antikūnų, naudojami kaip gydymieji ginklai. Be to, 14F7 antikūno scFv tipo fragmentų ekspresija ant M13 filamentinio fago paviršiaus įgalina gydomaisiais tikslais paveikti prisirišimo vietą ir gaunamus variantus su aukštesniu giminingumu.

Vienas iš šio išradimo tikslų yra antikūno fragmentų, kurie tik dalinai išsaugo 14F7 seką, bet išlaiko jo specifiškumą, giminingumą ir atpažinimo savybes, charakterizavimas.

Abu – ir modifikuotas antikūnas ir gauti fragmentai atpažįsta auglio ląstelių, kurios ekspresuoja NGcGM3 antigeną, specifiškumą, taip įgalinant juos būti naudojamus diagnozėje arba gydyme minėtų auglių ir turi privalumą gaunamo mažesnio imunogeniškumo, negu pelės antikūnas, iš kurio jie yra kilę.

Naujos terapinės kompozicijos, kurios apima modifikuotą 14F7 antikūną arba jo Fv viengrandį fragmentą, kur minėtas antikūnas arba fragmentas gali būti surišti su radioaktyviu izotopu, naudojamas lokalizuoti arba gydyti augliui, ekspresuojančiam antigeną yra šio išradimo objektas.

Taip pat šio išradimo objektas yra radioimunodiagnozės arba radioimunoterapijos metodas auglio, ekspresuojančio NGcGM3 gangliozidą, naudojant farmacines kompozicijas, kurios apima modifikuotą 14F7 antikūną arba jo fragmentą, surištą su radioaktyviu izotopu.

Detalus išradimo aprašymas.

Šiame išradime yra aprašytas chimerinis antikūnas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, gauto iš hibridomos su deponavimo numeriu ECACC 98101901, apibūdintas sunkiosios ir lengvosios grandinių hiper kintamų sričių (CDR) sekančiomis sekomis:

SUNKIOJI GRANDINĖ

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYYAMDY

LENGVOJI GRANDINĖ

CDR1: RASQSISSNNLH

CDR2: YASQSISS

CDR3: QQSNRWPLT

Geriau minėtas chimerinis antikūnas yra charakterizuojamas sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinių sričių (FR) sekančiomis sekomis:

SUNKIOJI GRANDINĖ

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

LENGVOJI GRANDINĖ

FR1: DLVLTQSPATLVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

Be to, chimerinis antikūnas charakterizuojamas žmogaus IgG1 sunkiosios grandinės pastovia sritimi ir žmogaus Ck lengvosios grandinės pastovia sritimi.

Geresniame pateikime šis išradimas susijęs su modifikuotu antikūnu, gautu iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios deponavimo numeris ECACC 98101901, išsiskiriantis dėl sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinės srities, turinčios bet kurią iš sekančių mutacijų:

SUNKIOJI GRANDINĖ

5 padėtis: Q pakeista į V

9 padėtis: N pakeista į A

11 padėtis: L pakeista į V

12 padėtis: A pakeista į V

18 padėtis: M pakeista į V

19 padėtis: K pakeista į R

20 padėtis: M pakeista į V

38 padėtis: K pakeista į R

40 padėtis: R pakeista į A

42 padėtis: D pakeista į G

48 padėtis: I pakeista į V

LENGVOJI GRANDINĖ

39 padėtis: R pakeista į K

40 padėtis: T pakeista į P

41 padėtis: H pakeista į G

42 padėtis: E pakeista į Q

58 padėtis: I pakeista į V

Geriau, minėtas modifikuotas antikūnas yra charakterizuojamas tuo, kad turi žmogaus IgG1 sunkiosios grandinės pastoviąją sritį ir žmogaus Ck lengvosios grandinės pastoviąją sritį.

Kitas šio išradimo aspektas tas, kad jis susijęs su iš hibridomos (deponuota ECACC 98101901) gauto 14F7 antikūno Fv tipo viengrandžiais fragmentais, kurie apima sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir kurie išsaugo 14F7 atpažinimo specifiškumą.

Geriau minėti Fv fragmentai apima lengvosios grandinės kintamas sritis, gautas iš neimunizuotų pelių arba žmogaus, skirtingai nuo lengvosios grandinės kintamos srities, produkuotos minėtos hibridomos, kas įgalina jų gavimą iš bakterijų-šeimininkių, kaip antikūnų fragmentus, esančius filamentiniuose faguose arba tirpiose molekulėse.

Šis išradimas yra taip pat susijęs su ląstelių linijomis, kurios ekspresuoja chimerinius ir humanizuotus antikūnus, ir bakterijų klonais, kurie produkuoja fragmentus, gautus iš 14F7.

Be to, šis išradimas yra susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, skirtomis gydyti ir/arba lokalizuoti ir identifikuoti piktybiniams krūties ir melanomos augliams, jų metastazėms ir recidyvams, charakterizuojamais buvimu vieno iš šio išradimo rekombinantinių monokloninių antikūnų arba jų fragmentų, taip pat tinkamu pritaikymui nešikliu. Minėtas antikūnas arba fragmentas gali būti surištas su radioaktyviu izotopu, naudojamu piktybinių auglių lokalizacijai ir/arba gydymui.

Galiausiai, šis išradimas yra susijęs su aprašytų antikūnų naudojimu gamyboje farmacinės kompozicijos, skirtos piktybinių auglių gydymui ir/arba lokalizacijai ir identifikacijai.

Kaip šį išradimą įvykdyti ir naudoti išdėstyta žemiau.

1. 14F7 pelių antikūno cDNR sintezė ir kintamos srities amplifikacija, naudojant PGR (polimerazinė grandininė reakcija).

14F7 pelių antikūnas buvo gautas imunizuojant Balb/c peles GM3 (NeuGc) gangliozidu, hidrofobiškai konjuguotu su mažo tankio lipoproteinais ir esant Freund'o adjuvantui (EP 0972782 A1, Carr A. ir kt., Hybridoma 19:3:241-247, 2000). RNR yra išskirta

iš 10^6 hibridomos ląstelių, produkujančių 14F7 monokloninį antikūną (pelių IgG1 Mab), kuris atpažįsta NGcGM3 gangliozidą, naudojant TRIZOL ekstrakcijos metodą (GIBCO BRL, NY), pagal gamintojo instrukciją.

Komplementarios DNR (cDNR) sintezė ir VH ir VL kintamųjų sričių amplifikacija buvo atlikta, naudojant reagentų rinkinį: Access RT-PCR (Promega, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Trumpai, reakcija vykdoma iš 5 ml RNR esant 25 pmol dT oligonukleotido, numatyto hibridizacijai RNR poliA srityje ir atitinkamų oligonukleotidų, ypatingų kiekvienai kintamai sričiai: VH ir VL. Inkubuojama 10 min. prie 60 °C ir vėliau pridedamas mišinys, turintis 0,2 mM kiekvieno dezoksiribonukleotido (dNTP), 1 mM $MgSO_4$, 5 μ AMV-atvirkštinės transkriptazės ir 5 μ l DNR polimerazės reakcijos buferyje iki galinio tūrio 50 μ l. Pavyzdžiai inkubuojami 45 minutes prie 48 °C, 2 minutes prie 94 °C ir vėliau amplifikuojami 40 ciklų PGR reakcijoje, esant sekančioms temperatūroms: 94 °C (30 sekundžių), 60 °C (1 minutė), 68 °C (2 minutės), ir galinė inkubacija 68 °C 7 minutės.

2. Chimerinių genų konstravimas ir amplifikuotos cDNR sekvenavimas.

VH ir VK PGR produktai skaidomi restrikcijos fermentais *Eco* RV-*Nhe* I (VH) ir *Eco* RV-*Sal* I (VK) ir klonuojami į atitinkamą ekspresijos vektorių (Coloma M.J. ir kt., J. Immunol. Methods 152:89-104, 1992). VH sritis klonuota į PAH4604 vektorių, kuris turi žmogaus IgG1 pastovią sritį ir kaip atrankos žymenį geną, atsparų L-histidinoliui. VK sritis klonuota į vektorių PAG4622, kuris turi mikofenolinės rūgšties atsparumo geną ir pastovią žmogaus kappa sritį. Galutinės genetinės konstrukcijos buvo atitinkamai pavadintos 14F7VH-PAH4604 ir 14F7VK-PAG4622.

Abi konstrukcijos yra sekvenuotos didezoksiribonukleotidų metodu (Sanger F. ir kt., PNAS USA 74:5463-5470, 1979), naudojant T7 DNR polimerazės sekvenavimo reagentų rinkinį (Amersham-Pharmacia) pagal gamintojo aprašytą protokolą.

3. Chimerinio antikūno ekspresija.

NSO ląstelių elektroporacija vykdoma su 10 μ g 14F7VH-PAH4604 linearizuotos *Pvu* I fermentu. DNR išsodinama etanoliu, sumaišoma ir ištirpinama PBS (fosfatinio buferio druskos tirpalas). Maždaug 10^7 ląstelių auginama iki pusiau konfluentumo ir surenkamos centrifuguojant. Vėliau ląstelės suspenduojamos 0,5 ml PBS kartu su DNR elektroporacijos inde. Po 10 min. laikymo lede ląstelės paveikiamos 200 V ir 960 F impulsu ir laikomos lede 10 min. Ląstelės auginamos 96 šulinėlių plokštelėse Dulbecco modifikuotoje selektyvioje auginimo terpėje (DMEM-F12) su 10 % fetalinio veršelių serumo (FCS) ir 10 mM L-histidinolio. Transfekuoti klonai tampa matomi praėjus 10 dienų pridėjus atrankos terpės.

Chimerinio imunoglobulino gamyba yra nustatoma ELISA iš klonų supernatanto. Šiam tikslui polistireno plokštelės (aukšto susirišimo, Costar) padengiamos ožkų antiserumu prieš žmogaus IgG karbonatiniame-bikarbonatiniame buferyje 100 mM, pH 9,8 per naktį prie 4 °C. Po to plokštelės plaunamos PBS-Tween (fosfatinio buferio druskos tirpalas, 0,5 % Tween-20, pH 7,5), ir kultūros supernatanto pavyzdžiai atskiesti PBS-Tween-FCS pridedami ir inkubuojami vieną valandą prie 37 °C. Plokštelės plaunamos vėl PBS-Tween ir inkubuojamos vieną valandą prie 37 °C ožkų anti žmogaus kappa grandinės serume, konjuguotame su peroksidaze (Jackson). Vėliau plokštelės plaunamos tuo pačiu būdu ir inkubuojamos su citratinio-fosfatinio buferio tirpalu pH 4,2 kuris turi substratą: o-fenilendiaminą. Po 15 minučių matuojama absorbcija prie 492 nm.

Chimerinio antikūno sugebėjimas atpažinti antigeną yra patikrinamas konkurencine ELISA, naudojant NGcGM3 ir NacGM3 gangliozidus. Trumpai, polistireno plokštelės (Polysorp, Nunc) padengiamos 50 µl 4 µg/ml NGcGM3 arba NacGM3 tirpalu metanolyje ir inkubuojamos vieną valandą prie 37 °C. Po to plokštelės blokuojamos 200 µl 1 %-inio jaučio serumo albumino tirpalu (BSA), pH 7,8-8,0 vieną valandą prie 37 °C. Po 3 plovimų su PBS, pavyzdžiai praskiesti 1 %-iniu Tris-HCl-BSA iki koncentracijos diapazone 2 µg/ml–0,01 µg/ml, esant 1 mg/ml biotinilinto 14F7 pelių antikūno prie 37 °C per 2 val. Po to plokštelės plaunamos PBS ir reakcija vykdoma su streptavidino-peroksidazės konjugatu (Jackson) prie 37 °C 1 val. Absorbcija matuojama prie 492 nm.

4. Humanizuotų 14F7hT antikūnų konstravimas humanizuojant T epitopus.

T epitopų prognozė.

14F7 kintamo domeno sekos analizuojamos AMPHI programa (Margalit H. Ir kt., J. Immunol. 138: 2213-2229, 1987), kuri leidžia identifikuoti 7 arba 11 aminorūgščių segmentus, turinčius amfifilinę spiralinę struktūrą, kuri gali būti susijusi su T ląstelių imunogeniškumu. Šie algoritmai šiuo atveju numato fragmentus, susijusius su pelių monokloninio antikūno sunkiosios ir lengvosios grandinių kintamų sričių T epitopų buvimu.

Homologijos su žmogaus imunoglobulinais analizė.

14F7 kintamojo domeno aminorūgščių sekos palygintos su aprašytais žmogaus imunoglobulino kintamosios srities sekomis, kad būtų identifikuotas žmogaus imunoglobulinas, turintis aukščiausią homologiją su analizuojama pelės molekule. Šiam tikslui galima naudoti SWISSPROT duomenų bazę, esančią internete, per BLAST programą (Altschul S.F. ir kt., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997).

Imunogeniškumo sumažinimo analizė.

Metodo esmė glūdi imunogeniškumo sumažinimo pasiekime nutraukiant arba humanizuojant galimus T epitopus su minimaliomis mutacijomis FR, specifiskai tuose segmentuose, kurie turi amfifilinę spiralinę struktūrą, išskyrus padėtis, susijusias su antigeno atpažinimo vietos trimatėmis struktūromis.

Pagal metodą pelių imunoglobulino VH ir VL kintamųjų sričių sekos yra palygintos su tokiomis aukščiausios homologijos žmonių sekomis ir liekanos, kurios skiriasi tarp pelių ir žmogaus sekų yra identifikuotos tik amfifilinėse srityse, kurios yra FR srityje (Kabat e., Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health, 1991). Tokios "pelių" liekanos turėtų būti linkę būti mutuotos į tokias, kurios randamos tose pačiose pozicijose žmogaus sekose.

Liekanos, esančios FR pozicijose, atsakingos už kanoninę struktūrą, kurios yra Verniero zonoje, arba dalyvauja VH-VL interfazės sąveikoje negali būti mutuotos, kadangi tai gali įtakoti į antikūno kintamosios srities domeno trimatę struktūrą ir taip paveikti prisirišimą prie antigeno. Be to, informacija apie pasiūlytų pakaitų įtaką tretinei struktūrai gali būti gauta kintamosios srities molekulinio modeliavimu.

Nuo to laiko analizėje mutacijos elementų, tokių kaip prolinio liekanų buvimas amfifilinėje spiralėje arba faktas, kad kai kurios pelių liekanos negali atsirasti toje pačioje padėtyje labiausiai homologinėje žmogaus sekoje, bet yra dažnos kituose žmogaus imunoglobulinuose, galima galvoti, kad galima gauti versiją, kuri turi maksimaliai mutacijų, tai yra, kur visos pelių liekanos, kurios skiriasi nuo žmogaus sekų yra mutuotos, bet kitos versijos gali būti su skirtingais mutacijų deriniais.

Identifikavus 14F7 pelių sekos galimus T epitopus ir juose identifikavus segmentus, kuriuose liekanos yra skirtingos negu žmogaus, pakeitimai atliekami įprastine tiesioginės mutagenizės technika.

Humanizuotų 14F7hT antikūnų klonavimas ir ekspresija NSO ląstelėse.

Jeigu 14F7hT antikūno VH ir VL sritims atitinkančios genetinės konstrukcijos gautos prieš tai aprašytu metodu, jos klonuojamos į atitinkamus ekspresijos vektorius, panašius kaip aprašyta aukščiau chimerinių antikūnų konstrukcijos atveju, gaunant sekančias genetines konstrukcijas: 14F7hTVK-PAG4622 ir 14F7hTVH-PAH4604. Šių genų transfekcija į NSO ląsteles vykdoma tiksliai tomis pačiomis sąlygomis, aprašytais chimeriniams antikūnams. Klonai, produkuojantys humanizuotą antikūną, taip pat nustatomi ELISA metodu.

Antigeno atpažinimo humanizuotu antikūnu sugebėjimas yra patikrintas konkurentinės ELISA metodu, naudojant NGcGM3 ir NacGM3 gangliozidus. Procedūra yra identiška aprašytai chimeriniams antikūnams.

5. Antikūnų fragmentų bibliotekų konstravimas filamentiniuose faguose iš 14F7 hibridomos.

Informacinė RNR išskiriama iš 14F7 hibridomos ląstelių, sintezuojama komplementari DNR, ir sekos atitinkančios sunkiosios ir lengvosios grandinių kintamoms sritims atskirai amplifikuojamos, naudojant du rinkinius nukleotidų, skirtų hibridizuotis su plačiu spektru pelių kintamųjų sričių. Kiekviena amplifikuotos sunkiosios grandinės kintama sritis yra išgryninta, sukarpyta su atitinkamais fermentais ir sujungta su pHG-1m fagemidiniu vektoriumi (sukonstruotu viengrandžių antikūnų ant filamentinių fagų paviršiaus pateikimui), prieš tai sukarpytu su tais pačiais fermentais. Sujungimo reakcijos produktai išvalyti ir elektroporacijos būdu įvesti į *E. coli* TG1 bakterinį kamieną. Transformuotos bakterijos sudaro sunkiosios grandinės kintamos srities ribotos įvairovės (visos iš jų gautos iš 14F7 hibridomos) dalinę biblioteką. DNR atitinkanti šiai dalinei bibliotekai yra išvaloma ir atskirai sujungiama su lengvosios grandinės kintamų sričių kolekcija (prieš tai išvalyta ir sukarpyta su atitinkamais fermentais). Galiausiai jų genetinės konstrukcijos buvo elektroporacijos būdu įvestos į TG1 kamieno bakterijas, kad prisiderintų prie skirtingų tipų nepriklausomų bibliotekų. Egzistuoja grandinių apsisiekimo bibliotekos, kuriose hibridomos sunkiosios grandinės kintamos sritys yra sumaišomos su lengvosios grandinės kintamų sričių skirtinga kolekcija, gauta iš pelių ir žmogaus limfocitų.

6. Klonų, produkuojančių antikūnų fragmentus prieš N-glikolil-GM3, išskyrimas ir charakterizavimas.

Iš kiekvienos bibliotekos paimamos atsitiktinės kolonijos fagų dauginimui, naudojant pagalbinį fagą M13 K07. N-glikolil-GM3 atpažinimas fagais, turinčiais antikūno fragmentus, analizuojamas tiesiogiai kietoje fazėje imunofermentiniu testu (ELISA). Taip nustatomi klonai, turintys funkcinis fragmentus. Fagai, turintys antikūno fragmentus, iš bendro transformuotų bakterijų mišinio, kurie formuoja kiekvieną biblioteką, yra gaminami gavimui ruošinių, turtingų funkcionaliais antikūnų fragmentais ir ištiria bibliotekų įvairovę. Gautas fagų mišinys patalpinamas sąlytyje su N-glikolil-GM3 antigeno riba ant kieto paviršiaus, fagai, turintys antikūno fragmentą ir sugebantys susirišti yra išsaugomi ir liekana pašalinama nuodugniu plovimu. Prisirišę fagai išplaunami keičiant pH ir išdauginami, siekiant gauti naują fagų mišinį, kuris tarnautų kaip pradinė medžiaga naujam antigenų atrinkimo ciklui. Po daugelio atrinkimo ciklų analizuojamas atpažinimas antikūno fragmentų, esančių fagų kolonijose. Taigi, papildomi klonai, produkuojantys funkcinis fragmentus, praskiesti pradinėje bibliotekoje yra identifikuojami.

Klonų produkuotų antikūno fragmentų charakterizavimas apima specifiškumo analizę ELISA metodu prieš giminingų ganglioizidų plokštelę, auglio atpažinimo tyrimą imunohistochemijos metodu, jų sugebėjimo būti produkuotiems kaip tirpių antikūnų funkcinių fragmentų nustatymą (įvertinimą) jiems nesant faguose ir jų kintamų sričių pilną sekvenavimą.

Pavyzdžiai:

Sekančiuose pavyzdžiuose visi naudojami restrikcijos arba modifikacijos fermentai, kaip ir reagentai bei medžiagos, buvo gauti iš komercinių šaltinių, jeigu neapibrėžta kitaip.

1 pavyzdys. 14F7 chimerinio monokloninio antikūno gavimas.

VH ir VK pelių kintamos srities cDNR sintezė ir amplifikacija PGR reakcija buvo atlikta su *Vent* polimeraze, naudojant specifinius oligonukleotidus su *EcoRV-NdeI* restrikcijos vietomis dėl VH ir *EcoRV-SalI* dėl VK. Pakeisti oligonukleotidai buvo sekantys:

VH grandinei:

1 oligonukleotidas (hibridas signaliniame peptide):

5' ggg gatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

2 oligonukleotidas (JH1 hibridas):

5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

VK grandinei:

1 oligonukleotidas (hibridas signaliniame peptide):

5' ggg gatc cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

2 oligonukleotidas (VLJ5 hibridas):

5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

VH ir VL PGR produktai buvo skaidomi restrikcijos fermentais *EcoRV-NdeI* (VH) ir *EcoRV-SalI* (VK) ir klonuoti kiekvienas į atitinkamus ekspresijos vektorius PAH4604 ir PAG4622, VH ir VK atitinkamai. Šie vektoriai naudojami imunoglobulinų ekspresijai žinduolių ląstelėse ir buvo padovanoti Sherie Morrison (UCLA, California, USA). PAH4604 vektorius turi žmogaus IgG1 pastovią sritį ir PAG4622 – žmogaus pastovią kappa sritį (Coloma J. ir kt., J. Immunol. Methods 152:89-104, 1992). Jeigu 14F7 VH ir VK sritys buvo klonuotos minėtuose vektoriuose, suformuotos 14F7VH-PAH4604 ir 14F7VK-PAG4622 struktūros.

Dvylika nepriklausomų klonų sekvenuota didezoksinuklotidų metodu (Sanger F. ir kt., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS USA 1979;74:5463-5470), naudojant T7 DNR polimerazės sekvenavimo rinkinį (Amersham-Pharmacia) pagal gamintojo aprašytą protokolą. VH ir VK sekos turi aukštą giminingumą atitinkamai su IIB ir V

pogrūpiams (1A ir B figūros) pagal Kabat klasifikaciją (Kabat E., Sequences of proteins of immunological interest, Fifth edition, NATIONAL institute of Health, 1991).

Buvo atliekama NSO ląstelių elektroporacija su 10 µg 14F7VH-PAH4604 ir 10 µg 14F7VK-PAG4622, linealizuotų *Pvu* I fermentu. DNR buvo išsodinta etanoliu, sumaišyta ir ištirpinta 50 µl PBS. Maždaug 10^7 ląstelių auginama iki pusiau konfluentumo, surenkamos centrifuguojant ir resuspenduojama 0,5 ml PBS kartu su DNR elektroporacijos inde. Po 10 min. laikymo lede, ląstelės veikiamos 200 V ir 960 F ir inkubuojamos 10 min. lede. Ląstelės buvo auginamos 96 šulinėlių plokštelėse rinktinėje Dulbecco modifikuotoje (DMEM-F12) terpėje su 10 % FCS ir 10mM L-histidinolio. Transfekuoti klonai tapo regimi praėjus 10 dienų po selektyvios terpės pridėjimo. Chimerinio imunoglobulino gavimas yra nustatytas ELISA metodu, naudojant klonų supernatantus. Šiam tikslui polistireno plokštelės (aukšto prisirišimo, Costar) yra padengiamos ožkų anti žmogaus IgG serumu (Sigma), 100 mM, pH 9,8 karbonato-bikarbonato buferyje per naktį prie 4 °C. Po to plokštelės plaunamos PBS-Tween (fosfatinio buferio druskos tirpalas, 0,5 % Tween-20, pH 7,5), ir užnešus kultūros supernatanto pavyzdžius, praskiestus PBS-Tween-FCS, inkubuojamos vieną valandą prie 37 °C. Plokštelės vėl išplautos PBS-Tween ir po to inkubuotos ožkos anti žmogaus kappa grandinės serume, konjuguotame su peroksidaze (Jackson), vieną valandą prie 37 °C. Vėliau plokštelės plaunamos tuo pačiu būdu ir inkubuojamos su pH 4,2 citrato-fosfato buferio tirpalu, kuris turi substratą: o-fenilendiaminą. Po 15 min. matuojama absorbcija prie 492 nm.

2 pavyzdys. 14F7Q antikūno reaktyvumas prieš NGcGM3 ir NAcGM3 antikūnus.

14F7 chimerinio antikūno (Ak) reaktyvumas buvo nustatytas konkurencinės ELISA metodu. 2 figūroje parodytas 14F7 chimerinio, palyginus su 14F7 pelių specifiskumas atpažįstant polistireno plokšteles (Polysorp, Nunc), padengtų N-glikozilintu-GM3 gangliožidu. Abu Ak, esantys panašiose koncentracijose, rodo 50 % antigeno atpažinimo inhibavimą biotinilintu pelių 14F7 antikūnu. Tuo tarpu, jeigu plokštelės padengtos N-acetilintu GM3 variantu, nebuvo stebima imunoreaktyvumo abiems antikūnams. Kaip nepriklausomas Ak buvo naudojamas pelių C5 Mab.

3 pavyzdys. Humanizuotų antikūnų skirtingų versijų gavimas.

14F7 VH ir VK sekos buvo palygintos su žmogaus sekų duomenų baze, gaunant labiausiai homologišką VH ir VK sričių 14F7 antikūno žmogaus seką (Fig. 1A ir B). Be to, abiejose sekose buvo nustatytos amfifilinės sritys arba potencialūs T epitopai. Vėliau mutacijos, reikalingos pakeisti pelių VH ir VK sekas į žmogaus sekas buvo nustatytos pagal ši

T epitopų humanizavimo metodą. Žemiau mes paminėsime maksimaliai galimas mutacijas, kurios gali būti atliktos.

VH srities atveju mutacijos įvedamos padėtyse 5, 9, 11, 12, 18, 19, 20, 38, 40, 42 ir 48, kur aminorūgštys Q, N, L, A, M, K, M, K, R, D ir I buvo pakeistos į V, A, V, V, V, R, V, R, A, G ir V atitinkamai. Šios mutacijos buvo atliktos persidengiant PGR produktams (Kamman M. ir kt., Nucleic Acids Research 17:5404-5410, 1989), naudojant 1 ir 2, bei 3 ir 4 oligonukleotidus pirmosiose PGR, ir rezultatai buvo perdengti kitoje PGR, naudojant tik 2 ir 4 oligonukleotidus. Naudotų nukleotidų sekos parodytos žemiau:

1 oligonukleotidas: 5' gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gaa gtg gta aaa cct ggg 3'

2 oligonukleotidas: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

3 oligonukleotidas: 5' ccc agg ttt tac cac ttc agc ccc aga ctg cac aag ctg gac 3'

4 oligonukleotidas: 5' ggg gatatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Kai tik ankstesnės mutacijos sekvenuojamos ir patikrinamos, į DNR įvedamos mutacijos 18, 19 ir 20 padėtyse, pakeičiant aminorūgštis M, K, M į V, R, V atitinkamai.

Žemiau parodyti 1 ir 2 oligonukleotidai ir 3 ir 4, aprašyti minėtoms mutacijoms. PGR produktų persidengimas buvo atliktas kaip aprašyta anksčiau.

Oligonukleotidai sunkiosios grandinės 18, 19 ir 20 mutacijoms:

1 oligonukleotidas: 5' ggg gcc tca gtg agg gtg tcc tgc agg 3'

2 oligonukleotidas: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

3 oligonukleotidas: 5' cct gca gga cac cct cac tga ggc ccc 3'

4 oligonukleotidas: 5' ggg gatatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Panašiai, kai tik ankstesnės mutacijos yra sekvenuotos ir patikrintos, R, A, G mutacijos buvo įvestos į 38, 40 ir 42 DNR padėtis, kurios atliekamos pakeičiant atitinkamai K, R D aminorūgštis.

Žemiau parodyti 1 ir 2, bei 3 ir 4 oligonukleotidai, aprašyti šioms mutacijoms. Persidengiantys PGR reakcijų produktai buvo atlikti kaip aprašyta prieš tai.

Oligonukleotidai sunkiosios grandinės 38, 40 ir 42 mutacijoms:

1 oligonukleotidas: 5' cac tgg tta aga cag gca cct ggc cag ggt ctg 3'

2 oligonukleotidas: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

3 oligonukleotidas: 5' cag acc ctg gcc agg tgc ctg tct taa cca gtg 3'

4 oligonukleotidas: 5' ggg gatatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Galiausiai, sekvenuojant patikrinus ankstesnes mutacijas, mutacija 48 padėtyje buvo įvesta į DNR, turinčią I aminorūgšties pakeitimą į V. Žemiau parodyti nukleotidai 1 ir 2, bei 3 ir 4, naudoti šioje mutacijoje. PGR reakcijų produktų persidengimas buvo atliktas kaip aprašyta aukščiau.

Oligonukleotidai sunkiosios grandinės 48 mutacijai:

1 oligonukleotidas: 5' ctg gaa tgg gtt gga tac att 3'

2 oligonukleotidas: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

3 oligonukleotidas: 5' aat gta tcc aac cca ttc cag 3'

4 oligonukleotidas: 5' ggg gatata cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt etc ttc ctg 3'

Visos šios mutacijos buvo patikrintos sekvenuojant. Gauta genetinė konstrukcija buvo pavadinta 14F7hTVH.

Sunkiosios grandinės atveju yra skirtingos aminorūgštys tarp VH 14F7 ir labiausiai panašiausių tokių žmogaus sekų, kurios nebuvo mutuotos, kadangi šie pakeitimai apėmė Vernier zonos aminorūgštis arba jos yra raktinėse pozicijose antigenų atpažinime.

Lengvojoje grandinėje buvo įvestos mutacijos 39, 40, 41, 42 ir 58 padėtyse, pakeičiant R, T, H, E, I atitinkamai į K, P, G, Q ir V. Mutacijos buvo įvestos tuo pačiu būdu, kaip ir sunkiosios grandinės. Žemiau aprašytos naudotos oligonukleotidų sekos.

Oligonukleotidai lengvosios grandinės 39, 40, 41 ir 42 mutacijoms.

1 oligonukleotidas: 5' tat caa caa aaa cca ggt cag tct cca agg 3'

2 oligonukleotidas: 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

3 oligonukleotidas: 5' cct tgg aga ctg acc tgg ttt ttg ttg ata 3'

4 oligonukleotidas: 5' ggg gatata cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

Po ankstesnių mutacijų patikrinimo sekvenuojant, į 58 padėtį buvo įvesta mutacija į DNR, taip pakeičiant aminorūgštį I į V. Žemiau parodyti nukleotidai 1 ir 2, bei 3 ir 4, naudoti šiai mutacijai. PGR produktų persidengimas buvo atliktas kaip aprašyta anksčiau.

Oligonukleotidai lengvosios grandinės 58 mutacijai:

1 oligonukleotidas: 5' att tct ggg gtc ccc tcc agg 3'

2 oligonukleotidas: 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

3 oligonukleotidas: 5' cct gga ggg gac ccc aga aat 3'

4 oligonukleotidas: 5' ggg gatata cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

Kai tik mutacijos buvo atliktos, jos buvo patikrintos sekvenavimu.

Gauta genetinė konstrukcija buvo pavadinta 14F7hTVK.

Humanizuotų sričių VK ir VH buvo klonuotos į vektorius PAG4622 ir PAH4604, atitinkamai suformuojant konstrukcijas 14F7hTVH-PAH4604 ir 14F7hTVK-PAG4622. Buvo vykdoma NSO ląstelių elektroporacija su 10 µg kiekvieno vektoriaus, kuris turi humanizuotą kintamą sritį 14F7hTVH-PAH4604 ir 14F7hTVK-PAG4622, prieš tai linearizavus skaldant

Pvu I. Elektroporacijos procesas ir klonų, kurie ekspresuoja 14F7hT humanizuotą antikūną nustatymas, buvo identiškai aprašytam chimeriniam antikūnui.

4 pavyzdys: 14F7 antikūno poveikis į auglio augimo sumažėjimą angiogenezės modelyje *in vivo*.

B16 melanomos auglio ląstelių linija sumaišyta su matricos geliu, kaip angiogenezės induktoriumi, buvo naudojama kaip modelis angiogenezei *in vivo*.

Auglio angiogenezės proceso indukcija buvo matuojama auglio liniją (B16) su matricos geliu implantuojant po oda C57/BL6 linijos pelių patinų papildvėje. Šiam tikslui melanomos B16 ląstelės buvo sumaišytos su 0,5 ml matricos gelio ir 64 vienetais/ml heparino kontrolinėje grupėje arba derinyje su kitais antikūnais, kad būtų įvesta poodinėmis injekcijomis į gyvūnų pilvo sritį. Penkiolika dienų po inokuliacijos gyvūnai buvo skerdžiami ir gelio grūdėliai buvo išimti kartu su odos ir epidermio liekanomis ir mikroskopiškai tiriamas auglio dydis. 3 figūroje parodyta kiek stipriai sumažėja auglio masė iš pelių auglių, gydytų su 14F7.

Norint įžiūrėti naujas kraujagysles yra atliekama hematoksilinu/eozinu nudažyto ir su imunodažymu su anti PECAM Mab (endotelio žymuo) nudažyto gelio histopatologinė analizė. 4 figūroje A ir B yra nustatytas kraujagyslių skaičiaus mažėjimas audinių pjūvyje tų gyvūnų, kurie buvo veikti 14F7, palyginus su negydytų gyvūnų auglio pjūviu.

5 pavyzdys: 14F hibridomos antikūnų fragmentų bibliotekos konstravimas filamentiniuose faguose.

Informacinė RNR buvo išskirta su TriPure Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, Germany) iš $5,0 \times 10^6$ 14F7 hibridomos ląstelių ir komplementari DNR buvo susintetinta su Pro-STAR First Strand RT-PCR reagentų rinkiniu (Stratagene, USA). Kintamosios sritys sunkiosios ir lengvosios grandinių, gautų iš hibridomos, buvo amplifikuotos per 26 polimerazinės grandininės reakcijos ciklus, sekančiomis sąlygomis: 50 sek. Prie 94 °C, 1 min. Prie 55 °C, 1 min. Prie 72 °C. Šiam tikslui buvo naudojami visi galimi degeneruotų nukleotidų rinkinio deriniai (sukonstruoti hibridizuojant su plačia įvairove pelių kintamų sričių), kurios parodytos sekančioje lentelėje:

Oligonukleotidai naudoti VH ir VL amplifikavimui. Išsigimę padėtys oligonukleotidų sekoje parodytos skliaustuose. Restrikcijos vietų sekos yra pabrauktos.

VH 5' Apa LI

5'... ttc tat tct cac agt gca cag (gc)ag gt(gt) cag ct(gt) ac(ag) cag tc(at) gga 3'

5'... ttc tat tct cac agt gca cag gc(ag) gt(ct) ca(ag) ctg cag cag ct(ct) ggg gc 3'

5'... ttc tat tct cac agt gca cag ga(ag) gtg aag ct(gt) (gc)t(gc) gag tct gg(ag) gga 3'

VH 3' *Sfi* I5'...ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cgc aga gac agt gac cag agt ccc 3'5'...ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cga gga gac ggt gac tga ggt tcc 3'5'...ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cga gga gac (gt)gt ga(gc) (ca)gt gga (gc)cc... 3'V_L 5' *Sal* I5'...gta ctc cag tcg acg aca ttg tg(ca) tg(at) t(ac)c agt ctc c... 3'5'...gta ctc cag tcg acg ata tcc aga tga c(ac)c a(ga)a ct(ac)... 3'5'...gta ctc cag tcg ac(cg) aaa ttg t(tg)c tca ccc agt ctc c... 3'V_L 3' *Not* I5'...aag gaa aaa agc ggc cgc ttt (tc)a(tg) (tc)tc cag ctt ggt... 3'5'...aag gaa aaa agc ggc cgc ttt (tg)a(tg) ctc caa ctt gt(gt)... 3'

Amplifikuotos sunkiųjų grandinių kintamos sritys buvo išvalytos ir po to skaldomos restrikcijos fermentais *Sfi* I ir *Apa* LI. Restrikcijos produktai buvo išvalyti ir įjungti į fagemidinį vektorių pHG-1m (Heber Biotec S.A., Cuba) (5 figūra). Su gauta genetinė konstrukcija eletroporacijos būdu buvo transformuotas *E. coli* bakterijų TG1 kamienas. Grupė transformuotų bakterijų, atitinkanti sunkiosios grandinės kintamos srities dalinę biblioteką, gauta iš 14F7 hibridomos, su vidutiniu narių dydžiu $2,3 \times 10^4$. Dalinės bibliotekos plazmidinė DNR buvo išvalyta ir po to skaldoma su *Not* I ir *Sal* I fermentais. Ši DNR atskirai buvo sujungta su keturiomis kolekcijomis lengvosios grandinės kintamų sričių, prieš tai suskaidytų su tais pačiais fermentais. TG1 kamieno bakterijos buvo transformuotos šiomis naujomis genetinėmis konstrukcijomis ir gautos keturios nepriklausomos bibliotekos. Viena iš jų buvo ribotos įvairovės mini-biblioteka, turinti abiejų – sunkiosios ir lengvosios grandinių, gautų iš 14F7 hibridomos, kintamas sritis, kurios narių dydis $1,6 \times 10^6$. Kitos trys buvo grandinių apsikeitimo bibliotekos, kurios įjungė skirtingas lengvosios grandinės kintamų sričių kolekcijas, gautas prieš tai iš pelių (kappa izotipas) ir žmonių (kappa ir lambda izotipai) ir jų narių dydžiai buvo $1,0 \times 10^7$, $1,4 \times 10^6$ ir $1,2 \times 10^6$ atitinkamai.

6 pavyzdys: Klonų, produkuojančių antikūnų fragmentus prieš N-glikozil GM3, išskyrimas.

Buvo gauti fagai, turintys antikūnų fragmentus iš 92 klonų, atrinktų atsitiktinai iš kiekvienos bibliotekos, mikropateikimo plokštelių šulinėliuose pagal aukščiau aprašytą procedūrą Marks J.D. ir kt., J. Mol. Biol. 222, 581-597, 1991). Jie specifiškai buvo įvertinti ELISA metodu ant polivinilchlorido plokštelių (Costar, USA) padengtų N-glikolil-GM3 ir N-acetil-GM3 iki $1 \mu\text{g/ml}$. Surišti fagai buvo nustatyti su anti-M13 monokloniniu antikūnu, konjuguotu su peroksidaze (Amersham, Sweden). Be to, atsitiktinai atrinktų individualių

klonų charakterizavimui buvo atlikta atranka fagų, sugebančių susiristi su N-glikolil-GM3 iš fagų mišinio, gautų iš bakterijų grupės kuri atitinka kiekvienai bibliotekai. Šiam tikslui fagai buvo gaunami naudojant pagalbinį M13K07 fagą, jie buvo išvalyti išsodinant su polietilenglikoliu pagal minėtą procedūrą ir sudedami į kontaktą su N-glikolil-GM3 riba ant plastikinio paviršiaus (Immuno tubes, Nunc, Denmark). Vamzdeliai buvo ekstensyviai plaunami ir fagai išplaunami esant 100 mmol/l trietilamino. Eliuatas buvo neutralizuotas ir naudojamas infekuoti *E. coli* TG1 bakterijų kamieną. Iš infekuotų bakterijų grupės fagai, turintys antikūną, buvo padauginėti ir išvalyti, kad vėl būtų panaudoti kaip startinė medžiaga naujam atrinkimo etapui tokiomis pat sąlygomis, kaip čia aprašyta. Po keturių atrankos ciklų, iš kiekvienos bibliotekos atsitiktinai buvo atrinktos 92 fagais infekuotos bakterijų kolonijos ir buvo atliktas N-glikolil-GM3 atpažinimas panašioje formoje, kaip iš bibliotekų atrinktų klonų įvertinimas.

Iš tiesioginės bibliotekų klonų analizės, produkuojantys klonai buvo išskirti iš fagų, turinčių antikūnų fragmentus, kurie atpažįsta N-glikolil-GM3, kurie buvo rasti kintamu dažnumu trijose grandinių apsikeitimo bibliotekose. Nebuvo rasta teigiamų klonų mini bibliotekoje, suformuotoje išimtinai iš kintamų sričių, gautų iš 14F7 hibridomos. Po atrinkimo ciklų papildomi klonai buvo išskirti iš grandinių apsikeitimo bibliotekų ir nė vienas nebuvo rastas originalių sekų mini bibliotekoje. Sekančioje lentelėje parodyta kiekis klonų, produkuojančių antikūnų fragmentus, kurie atpažįsta N-glikolil-GM3 ir dažnumą, kurį jie simbolizuoja bendrame iš kiekvienos bibliotekos analizuojamų klonų skaičiuje. Pasitaikė tikrai vieną kloną produkuojantis fagas su priešingu reaktyvumu N-acetil-GM3 atžvilgiu.

Biblioteka	Teigiamų klonų dažnumas (tiesioginis atrinkimas)	Teigiamų klonų dažnumas (keturi atrankos ciklai)
14F7 hibridomos mini biblioteka	0/92	0/92
Pelių lengvųjų kappa grandinių apsikeitimas	31/92(33,70 %)*	52/92 (56,52 %)
Žmogaus lengvųjų kappa grandinių apsikeitimas	2/92 (2,17 %)	8/92 (17,39 %)
Žmogaus lengvųjų lambda grandinių apsikeitimas	4/92 (4,35 %)	12/92 (13,04 %)

*Vienas klonas su priešingu reaktyvumu N-acetil-GM3.

LT 5353 B

7 pavyzdys: Charakterizavimas antikūnų fragmentų, gautų iš 14F7, kuris atpažįsta N-glikolil-GM3

11 antikūnų fragmentų kintamos sritys buvo pilnai sekvenuotos automatinio sekvenatoriumi ALF EzpressII (Pharmacia, Sweden), naudojant nukleotidus, kurie hibridizuoja vektoriaus pGH-1m srityse, kurios susisiečia su sekos, koduojančios įterptą antikūno fragmentą, 5' ir 3' galais. Buvo nustatyta, kad visų sunkiųjų grandinių kintamos srities seka atitinka paskelbtai 14F7 sekai, pakeitimai pasitaiko tik 1 ir 4 struktūrinėse srityse, tikėtina įvestų naudojant išsigimusius oligonukleotidus PGR reakcijos metu. Sekos atitaisymas, apimantis tris CDR neturi variacijų. Priešingai, lengvosios grandinės kintamos srities 11 klonų sekos buvo visos skirtingos nuo 14F7 sekų ir sugrupuotos į 5 skirtingų sekų grupes: dvi pelių kilmės ir viena žmogaus kilmės (kappa izotipas) ir dvi kitos žmogaus kilmės, bet lambda izotipas. Vienas klono atstovas iš kiekvienos sekų grupės buvo pateiktas vėlesnei cha

Sekančioje lentelėje parodyti skirtumai tarp atrinktų klonų lengvosios grandinės kintamų sričių, atsižvelgiant į pradinį identiškumą, kilmę ir izotipą, bei suskirstymą į pogrupius pagal Kabat klasifikaciją.

	VL sritis	Izotipas	Tapatumas su VL 14F7	Pogrupis
AcM 14F7	pelių	kappa	-	V
ScFv 2Am	pelių	kappa	59,46 %	III
ScFv 3Fm	pelių	kappa	59,81 %	V
ScFv 7Bhk	žmogaus	kappa	60,74 %	I
ScFv 7Ahl	žmogaus	lambda	35,45 %	I
ScFv 8Bhl	žmogaus	lambda	37,04 %	III

Skirtumai tarp klonų lengvųjų grandinių kintamų sričių ir tokių sričių paskelbtų pagal kilmę 14F7 antikūnams yra išsidėstę per visą seką, įskaitant tris komplementariai apibrėžtas sritis ir yra parodytos žemiau (6 figūra).

Fr1

```

14F7 Mab  D L V L T Q S P A T L S V T P G D S V S F S C
2Am scFv  . I . M F . . . S . A . S L . Q R A T I . .
3Fm scFv  . I Q M . . T . S S . . A S L . . R . T I . .
7Bhk scFv  . I Q M . . T . S S . . A S V . . R . T I T .
7Ahl scFv  Q S V V . . P . S   A . G G . . Q . L T I . .

```

8B hI scFv S S E L . . D . . V . . A L . T . R I T .

CDR 1

```

R A S Q      S I S N N L H
. . . . S V S S . S Y S Y M .
. . . .      D . . . Y . N
. . . .      . . . S F . N
T G T S S D V G G Y . H V S
Q G D S      L R . Y Y A S

```

Fr 2

```

W Y Q Q R T H E S P R L L I K
. . . . K P G Q P . K . . . .
. . . . K P D G T V K . . . V
. . . . K P G K A . K . . . Y
. . . . H P G K A . K . M . Y
. . . . K P G Q A . V . V . Y

```

CDR 2

```

Y A S Q S I S
. . . N L E .
. T . R L H .
A . . N L Q .
D V . K R P .
G K N N R P .

```

Fr 3

```

G I P S R F S G S G S G T D F T L S I I A V E T E D F G M Y F C
. V . A . . . . . . . . . . N . H P . . E . . A A T . Y .
. V . . . . . . . . . . Y S . T . S N L . Q . . I A T . . .
. V . . . . . . R . . . . . T . S S L Q P . . . A A . Y .
. V . H . . . . . K . . N T A S . T V S G L Q A . . E A V . Y .
. . . D . . . . . S . . N T A S . T . T G A Q A . . E A D . Y .

```

CDR 3

```

Q Q S N R W P      L T F
. H . R D V .      . . .
. . G . T L .      P . .
. . G Y T T .      . . .
S S Y A G S N N . V .
N S R D S S G N H V V .

```

Fr 4

```

G A G T K L E L K
. . . . . I .
. . . . .
. Q . . . . .
. G . . . V T V L
. G . . . . T V L

```

Prisirišimo specifiškumas, patvirtintas ELISA metodu pagal metodą, aprašytą naudojant padengimui papildomai prie N-glikolil-GM3 ir N-acetil-GM3 plokštelę su giminingais gangliozidais, kurie apima įvairius N-acetilintus gangliozidus. 7 figūroje parodytas skirtingų

antigenų atpažinimas 5 klonais, produkuojančiais būdingus antikūno fragmentus. Buvo stebimas tik N-glikolil-GM3 prisijungimas prie taikinio antigeno.

Tirpių antikūno fragmentų gavimas (be fagų konteksto) iš klonų buvo indukuotas esant 1mmol/l izopropiltiogalaktopiranozido. Supernatantas buvo surinktas ir periplazminės frakcijos buvo gautos pagal nustatytas procedūras (de Haard H., J. Biol. Chem. 274, 18218-18230, 1999). N-glikolil-GM3 atpažinimo aktyvumas buvo nustatytas ir kultūros supernatante ir periplazminėse frakcijose ELISA metodu ant plokštelių, padengtų minėtu antigenu, panašiu į aprašytą, bet su sekančiomis modifikacijomis. Surišti antikūno fragmentai buvo nustatyti, naudojant 1E10 monokloninį antikūną (nukreiptą prieš *c-myc* peptidą, sulietą į genetinę konstrukciją su antikūno fragmentu) iki 10 µg/ml ir anti pelių imunoglobulino konjugatą (Sigma, USA). Antikūno fragmentai buvo išvalyti iš periplazminių frakcijų viena afinine chromatografija prieš metalo jonus, matrica naudojant HIS-Select HC Nickel Affinity Gel (Sigma, USA) pagal gamintojo instrukcijas. 8 figūroje parodytas išvalytų tirpių fragmentų aktyvumas, nustatytas ELISA metodu.

Trumpas figūrų aprašymas.

Fig. 1: Parodyta 14F7 Mab VH (a) ir VK (b) kintamų sričių aminorūgščių seka, ir atitinkama labiausiai homologiška žmogaus seka. CDR yra pabrauktos ir amfifilinės sritys bei potencialūs epitopai užtamsinti. Taip pat parodyta seka, gauta humanizavus kintamą sritį mutacijomis.

Fig. 2: 14F7Q antikūno atpažinimas, išmatuotas konkurencinės ELISA metodu.

X ašis: Išreiškia antikūnų koncentracijas.

Y ašis: Absorbacija, išmatuota prie 492 nm.

Ior C5 monokloninis antikūnas, naudojamas kaip negatyvi kontrolė.

Fig. 3: 14F7 monokloninio antikūno efektas į pelių auglio augimą (B16 melanomos auglio ląstelių linija).

Fig. 4: A) 14F7 monokloninio antikūno įtakos į kraujagyslių formavimąsi imunohistocheminis tyrimas. Rodyklės žymi imunonudažytas kraujagysles.

B) 14F7 monokloninio antikūno sukeltas angiogenezės slopinimas.

Fig. 5: pHG-1m vektoriaus diagrama.

Fig. 6: 14F7 monokloninio antikūno VL srities baltymo seka ir parinkti Fv viengrandžiai fragmentai. Taškai reiškia homologiją su 14F7 VL seka.

Fig. 7: Atpažinimo specifiškumas fagais, turinčiais antikūno fragmentus. Stebimas 14F7 antikūno prisirišimo inhibavimas prie gangliozido atvirais fragmentais fage. Plokštelės

padengtos N-glikolil-GM3 ir fagai inkubuojami su virusinėmis dalelėmis ir įvairiomis 14F7 koncentracijomis.

Fig. 8: N-glikolil-GM3 atpažinimas tirpiaais išvalytais fragmentais.

Išradimo apibrėžtis

1. Rekombinantinis antikūnas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, pagaminto hibridomos, kurios depozito ECACC Nr. 98101901, **b e s i s k i r i a n t i s** sunkiosios ir lengvosios grandinių hiper kintamų sričių (CDR) sekomis, parodytomis žemiau.

SUNKIOJI GRANDINĖ

CDR1: SYWIIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

LENGVOJI GRANDINĖ

CDR1: RASQSSNNLH

CDR2: YASQSS

CDR3: QQSNRWPLT

2. Antikūnas pagal 1 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad yra 14F7 antikūno chimerinis variantas, turintis minėto 14F7 antikūno sunkiųjų ir lengvųjų grandinių CDR sritis ir struktūrines sritis (FR), ir žmogaus IgG1 sunkiosios grandinės pastoviąją sritį, ir žmogaus Ck lengvosios grandinės pastoviąją sritį su sekančiomis sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinių sričių (FR) sekomis:

SUNKIOJI GRANDINĖ

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

LENGVOJI GRANDINĖ

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHEsprllik

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

3. Antikūnas pagal 1 ir 2 punktus, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad yra 14F7 monokloninio antikūno humanizuotas variantas, turintis sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinėse srityse (FR) taškinės mutacijas, mažinančias jo imunogeniškumą.

4. Antikūnas pagal 3 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad yra 14F7 monokloninio antikūno humanizuotas variantas, kurio sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinės sritys turi bet kurią iš sekančių mutacijų:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

5 padėtis: Q pakeista į V

9 padėtis: N pakeista į A

11 padėtis: L pakeista į V

12 padėtis: A pakeista į V

18 padėtis: M pakeista į V

19 padėtis: K pakeista į R

20 padėtis: M pakeista į V

40 padėtis: R pakeista į A

42 padėtis: D pakeista į G

LENGVOJI GRANDINĖ:

39 padėtis: R pakeista į K

40 padėtis: T pakeista į P

41 padėtis: H pakeista į G

42 padėtis: E pakeista į Q

5. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš 14F7 pelių monokloninio antikūno, produkuoto iš hibridomos su depozito numeriu ECACC 98101901, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir pelių antikūno lengvosios grandinės kintamą sritį.

6. Viengrandis Fv fragmentas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lengvosios grandinės kintama sritis yra pats 14F7 antikūnas.

7. Viengrandis Fv fragmentas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad sunkiosios ir lengvosios grandinių hiper kintamų sričių (CDR) sekos yra tokios, kaip parodytos žemiau:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYYAMDY

LENGVOJI GRANDINĖ:

CDR1: RASQSI>NNLH

CDR2: YASQSI

CDR3: QQSNRWPLT

8. Viengrandis Fv fragmentas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi minėto 14F7 antikūno sunkiosios ir lengvosios grandinių CDR sritis ir struktūrinės sritis (FR), kur sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinių sričių (FR) sekos yra sekančios:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

LENGVOJI GRANDINĖ

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

9. Viengrandis Fv fragmentas pagal 8 punktą, kuris sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinėse srityse (FR) turi taškinės mutacijas, mažinančias jų imunogeniškumą.

10. Viengrandis Fv fragmentas pagal 9 punktą, kurio sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinės sritys turi bet kurią iš sekančių mutacijų:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

5 padėtis: Q pakeista į V

9 padėtis: N pakeista į A

11 padėtis: L pakeista į V

12 padėtis: A pakeista į R

18 padėtis: M pakeista į V

19 padėtis: K pakeista į R

20 padėtis: M pakeista į V

40 padėtis: R pakeista į A

42 padėtis: D pakeista į G

LENGVOJI GRANDINĖ

39 padėtis: R pakeista į K

40 padėtis: T pakeista į P

41 padėtis: H pakeista į G

42 padėtis: E pakeista į Q

11. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios depozito numeris ECACC 98101901 pagal punktą 5, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr 1

D I V M F Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C

CDR 1

R A S Q S V S S S S Y S Y M H

Fr 2

W Y Q Q K P G Q P P K L L I K

CDR 2

Y A S N L E S

Fr 3

G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y Y C

CDR 3

Q H S R D V P L T F

Fr 4

G A G T K L E I K

12. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios depozito numeris ECACC 98101901, pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S L G D R V T I S C

CDR 1

R A S Q D I S N Y L N

Fr 2

W Y Q Q K P D G T V K L L I V

CDR 2

Y T S R L H S

Fr 3

G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C

CDR 3

Q Q G N T L P P T F

Fr 4

G A G T K L E L K

13. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios depozito numeris ECACC 98101901, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir žmogaus antikūno lengvosios grandinės kintamą sritį.

14. Viengrandis Fv fragmentas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

LT 5353 B

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S V G D R V T I T C

CDR 1

R A S Q S I S S F L N

Fr 2

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

CDR 2

A A S N L Q S

Fr 3

G V P S R F S G R G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A A Y Y C

CDR 3

Q Q G Y T T P L T F

Fr 4

G Q G T K L E L K

15. Viengrandis Fv fragmentas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr1

Q S V V T Q P P S A S G G P G Q S L T I S C

CDR 1

T G T S S D V G G Y N H V S

Fr 2

W Y Q Q H P G K A P K L M I Y

CDR 2

D V S K R P S

Fr 3

G V P H R F S G S K S G N T A S L T V S G L Q A E D E A V Y Y C

CDR 3

S S Y A G S N N L V F

Fr 4

G G G T K V T V L

16. Viengrandis Fv fragmentas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr1

S S E L T Q D P A V S V A L G T V R I T C

CDR 1

Q G D S L R S Y Y A S

Fr 2

W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y

CDR 2

G K N N R P S

Fr 3

G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C

CDR 3

N S R D S S G N H V V F

Fr 4

G G G T K L T V L

17. Ląstelių linija *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad ekspresuoja rekombinantinį antikūną pagal bet kurį 1-4 punktą.

18. Ląstelių linija *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad ekspresuoja viengrandį Fv fragmentą pagal bet kurį 5-16 punktą.

19. Farmacinė kompozicija, skirta piktybinių auglių gydymui, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad apima rekombinantinį antikūną pagal bet kurį 1-4 punktą

20. Farmacinė kompozicija, skirta piktybinių auglių gydymui, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad apima viengrandį Fv fragmentą pagal bet kurį 5-16 punktą ir atitinkamą nešiklį.

21. Farmacinės kompozicijos pagal 19 punktą panaudojimas piktybinių krūties auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų gydymui.

22. Farmacinės kompozicijos pagal 20 punktą panaudojimas piktybinių krūties auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų gydymui.

23. Reagentas piktybinių auglių lokalizavimui ir identifikavimui „*in vivo*“, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad apima rekombinantinį antikūną pagal bet kurį 1-4 punktą ir atitinkamą žymenį.

24. Reagentas pagal 23 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad yra naudojamas krūties piktybinių auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų lokalizavimui ir identifikavimui „*in vivo*“.

25. Reagentas, skirtas piktybinių auglių lokalizavimui ir identifikavimui „*in vivo*“, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad apima viengrandį Fv fragmentą pagal bet kurį 5-16 punktą ir atitinkamą žymenį.

26. Reagentas pagal 25 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad yra naudojamas krūties piktybinių auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų lokalizavimui ir identifikavimui.

SEKOS

<110> CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

<120> REKOMBINANTINIAI ANTIKŪNAI IR JŲ FRAGMENTAI,
ATPAŽIŠTANTYS N-GLIKOLIL-GM3 GANGLIOZIDUS, IR JŲ PANAUDOJIMAS
AUGLIŲ DIAGNOZEI IR GYDYMUI

<130> CU 92/2003

<140> CU 92/2003

<141> 2003-04-23

<160> 58

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(5)

<400> 1

Ser Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(17)

<400> 2

Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe
Lys
1 5 10 15

Asp

LT 5353 B

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(16)

<400> 3

Glu Ser Pro Arg Leu Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 Tyr
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(11)

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(7)

<400> 5

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT

LT 5353 B

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(9)

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Arg Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(30)

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asn Glu Leu Ala Lys Pro Gly
 Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 20 25 30

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(14)

<400> 8

Trp Leu Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

LT 5353 B

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(32)

<400> 9

Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met
 Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 Arg
 20 25 30

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(11)

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(23)

<400> 11

Asp Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro
 Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Phe Ser Cys

20

LT 5353 B

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(15)

<400> 12

Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys
1				5					10					15

<210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(32)

<400> 13

Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
Thr														
1				5					10					15

Leu	Ser	Ile	Ile	Ser	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Gly	Met	Tyr	Phe
Cys														
				20				25					30	

<210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(12)

<400> 14

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala **LT 5353 B**
 1 5 10

<210> 15
 <211> 43
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(43)

<400> 15
 ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctcttc ctg 43

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(30)

<400> 16
 ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt 30

<210> 17
 <211> 48
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(48)

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(43)

<400> 17
 ggggatatcc accatgggtat ttcttacacc tcagattacc ttggactt 48

<210> 18
 <211> 35
 <212> DNR

LT 5353 B

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(35)

<400> 18

agcgtcgact tacgtttcag ctccagcttg gtccc

35

<210> 19

<211> 42

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(42)

<400> 19

gtccagcttg tgcagtctgg ggctgaagtg gtaaaacctg gg

42

<210> 20

<211> 30

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(30)

<400> 20

ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt

30

<210> 21

<211> 42

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(42)

<400> 21

cccaggtttt accacttcag cccagactg cacaagctgg ac

42

LT 5353 B

<210> 22
<211> 43
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(43)

<400> 22
ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctcttc ctg 43

<210> 23
<211> 27
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(27)

<400> 23
ggggcctcag tgagggtgtc ctgcagg 27

<210> 24
<211> 30
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(30)

<400> 24
ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt 30

<210> 25
<211> 27
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(27)

<400> 25

cctgcaggac accctcactg aggcccc

<210> 26
<211> 43
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(43)

<400> 26
ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctcttc ctg

43

<210> 27
<211> 33
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(33)

<400> 27
cactgggtaa gacaggcacc tggccagggt ctg

33

<210> 28
<211> 30
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas
<222> (1)..(30)

<400> 28
ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt

30

<210> 29
<211> 33
<212> DNR
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> prim_transkriptas

LT 5353 B

<222> (1)..(33)

<400> 29

cagaccctgg ccaggtgcct gtcttaacca gtg

33

<210> 30

<211> 43

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(43)

<400> 30

ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctcttc ctg

43

<210> 31

<211> 21

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(21)

<400> 31

ctggaatggg ttggatacat t

21

<210> 32

<211> 30

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(30)

<400> 32

ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt

30

<210> 33

<211> 21

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

LT 5353 B

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(21)

<400> 33
 aatgtatcca acccattcca g

21

<210> 34
 <211> 43
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(43)

<400> 34
 ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctcttc ctg

43

<210> 35
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(30)

<400> 35
 tatcaacaaa aaccaggtca gtctccaagg

30

<210> 36
 <211> 35
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(35)

<400> 36
 agcgtcgact tacgtttcag ctccagcttg gtccc

35

<210> 37
 <211> 30

LT 5353 B

<212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(30)

<400> 37
 ccttgagac tgacctggtt ttgttgata

30

<210> 38
 <211> 48
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> lprim_transkriptas
 <222> (1)..(48)

<400> 38
 ggggatatcc accatggtat ttctacacc tcagattacc ttgactt

48

<210> 39
 <211> 21
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(21)

<400> 39
 atttctgggg tcccctccag g

21

<210> 40
 <211> 35
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(35)

<400> 40
 agcgtcgact tacgtttcag ctccagcttg gtccc

35

LT 5353 B

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(21)

<400> 41
 cctggagggg accccagaaa t 21

<210> 42
 <211> 48
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(48)

<400> 42
 ggggatatcc accatggtat ttctacacc tcagattacc ttggactt 48

<210> 43
 <211> 50
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(50)

<400> 43
 ttctattctc acagtgcaca ggcaggtgtc agctgtacag cagtcattgga 50

<210> 44
 <211> 51
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(51)

<400> 44

LT 5353 B

ttctattctc acagtgcaca ggcaggtctc aagctgcagc agctgtgggg c 51

<210> 45

<211> 53

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(53)

<400> 45

ttctattctc acagtgcaca ggaaggtgaa gctgtgctgc gagtctggag gga 53

<210> 46

<211> 50

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(50)

<400> 46

gaaccagtac tccaggcctg aggggccgca gagacagtga ccagagtccc 50

<210> 47

<211> 50

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> prim_transkriptas

<222> (1)..(50)

<400> 47

gaaccagtac tccaggcctg aggggccgag gagacggtga ctgaggttcc 50

<210> 48

<211> 54

<212> DNR

<213> *Mus musculus*

<220>

LT 5353 B

<221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(54)

<400> 48
 gaaccagtag tccaggcctg agggggccgag gagacgtgtg agccagtgga gccc54

<210> 49
 <211> 40
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(40)

<400> 49
 gtactccagt cgacgacatt gtgcatgatt accagtctcc 40

<210> 50
 <211> 40
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(40)

<400> 50
 gtactccagt cgacgatatc cagatgacac cagaactacc 40

<210> 51
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(39)

<400> 51
 gtactccagt cgaccgaaat tggtgctcac ccagtctcc 39

<210> 52
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

LT 5353 B

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(39)

<400> 52
 aaggaaaaaa gcggccgctt ttcattgtctc cagcttggt

39

<210> 53
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> prim_transkriptas
 <222> (1)..(39)

<400> 53
 aaggaaaaaa gcggccgctt ttgatgtctc aacttgtgt

39

<210> 54
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(111)

<400> 54

Asp Ile Val Met Phe Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
 Ser

20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
 Ala

50

55

60 **LT 5353 B**

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
His

65

70

75

80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser
Arg

85

90

95

Asp Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> DOMENAS

<222> (1)..(107)

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
Ile

35

40

45

Val Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
Gln

65
80

70

75

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 56
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> DOMENAS
<222> (1)..(107)

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser
Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Thr Pro
Leu

85

90

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 57
<211> 111
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> DOMENAS
<222> (1)..(111)

<400> 57

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ala Ser Gly Gly Pro
Gly
1 5 10 15

Gln Ser Leu Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly
Gly
20 25 30

Tyr Asn His Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro
Lys
35 40 45

Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro His
Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser
Gly
65 70 75
80

Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala
Gly
85 90 95

Ser Asn Asn Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

LT 5353 B

<210> 58
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> DOMENAS
 <222> (1)..(109)

<400> 58

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Thr Val Ser Val Ala Leu
 Gly
 1 5 10 15

Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr
 Tyr
 20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
 Ile
 35 40 45

Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 Gly
 50 55 60

Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
 Ala
 65 70 75
 80

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly
 Asn
 85 90 95

His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105