

Область изобретения

Осуществления данного изобретения касаются гуманизированных и химерных антител, фрагментов, полипептидов или их производных, которые способны связывать антиген аденокарциномных клеток, АF-20, который связан с клетками карциномы, особенно с клетками гепатокарциномы и аденокарциномы ободочной кишки и легкого.

Описание существующего уровня техники

В Соединенных Штатах рак - вторая ведущая причина смертности. Несмотря на значительный прогресс, с 1950 г. до настоящего времени случаи рака на 100000 душ американского населения не уменьшились; фактически этот показатель немного увеличился. Соответственно, сохраняется острая потребность разработки эффективных методов лечения рака и выявления новых подходов диагноза, оценки и мониторинга заболеваний раком.

Особенно необходимы методы профилактики и/или лечения целевых метастаз. Один из самых разрушительных аспектов рака - склонность клеток к образованию злокачественных неоплазм, которые далее распространяются от места их первичного образования и образуют метастазы в отдаленных органах. Несмотря на прогресс в области хирургического лечения первичных неоплазм и агрессивной терапии, большинство пациентов, страдающих от рака, умирают в результате метастатической болезни. Испытания на животных показывают, что приблизительно 0,01% циркулирующих раковых клеток от твердых опухолей успешно развивают метастатические колонии (Fidler, 1993). Моноклональные антитела (в дальнейшем «mAbs»), специфические к связанным опухолью антигенам, предлагают большие возможности в лечении рака и в наведении на метастазы.

Гепатоцеллюлярная карцинома - Гепатоцеллюлярная карцинома (в дальнейшем «HCC») - одна из ведущих в мире причин смертности, связанной с заболеванием раком. Больше, чем 80% карцином печени составляет HCC. Наблюдается широкое разнообразие в инцидентности HCC в различных частях мира, при этом инцидентность в Азии и Африке по крайней мере в десять раз больше, чем в Соединенных Штатах. Было идентифицировано множество факторов, которые имеют потенциальное значение в этиологии этой болезни. Хронические болезни печени типа хронической инфекции В вирусного гепатита (HBV) или С вирусного гепатита (HCV), или цирроза печени, предрасполагают индивидуумов к HCC. Исходя из высоких уровней HBV и HCV инфекций во многих частях мира, особенно в Азии и Африке, можно считать, что HCC является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний человечества. Предполагают, что афлатоксины, присутствующие в некоторых пищевых продуктах типа ореха и арахиса, предрасполагают индивидуума к HCC. Так как рак печени обнаруживается в 2-4 раза чаще у мужчин, чем у женщин, то гормональные факторы могут быть важны в этиологии HCC.

Возможности для прогнозирования HCC весьма скудные, болезнь часто заканчивается смертью в течение 3-6 месяцев. Только приблизительно 6% диагностированных с HCC переживают пять лет. Локальный HCC можно лечить хирургически, путем частичной гепатэктомии или общей гепатэктомии, с трансплантацией печени, или, в случае нерезектабельности, через абляционную терапию типа радиочастотной абляции, криохирургию, или подкожной инъекции этанола, или путем химиотерапии, при введении в печень посредством артериального вливания или хемотропизации. Только у 10-20% из всех больных HCC удается полностью удалить злокачественную ткань в результате хирургического вмешательства. Запущенную HCC можно лечить путем системной химиотерапии или лучевой терапии, однако с ограниченным эффектом и незначительным успехом.

Обычно симптомы HCC становятся очевидными только на поздних фазах болезни, в результате чего значительно затрудняется лечение. Диагностические испытания включают анализ в крови альфа-фетопротейна (AFP). Высокое содержание AFP указывает только на возможность наличия рака печени; однако диагноз этим не может быть подтвержден. Среди людей, страдающих от первичного рака печени, 50-75% имеют высокий уровень AFP. Другие болезни, чаще всего цирроз печени, Хронические инфекций гепатита и некоторые другие раковые заболевания также приводят к высоким уровням AFP. Кроме AFP-анализа в крови, дисфункцию печени можно идентифицировать также и множеством других испытаний, основанных на измерении активности фермента, содержания билирубина и уровня белка. На основе данных диагностической визуализации, типа сканирования печени, компьютерной томографии со сканированием, ультразвука или магнитно-резонансной визуализации (MRI), можно идентифицировать потенциальные опухоли печени и участки для биопсии. Однако, в отдельности, ни одно из этих испытаний не позволяет диагностировать рак печени. Биопсия печени все еще остается лучшим способом для постановки определенного диагноза HCC. В основном, процедура безопасна, хотя меньше чем в 0,5% случаев, возможны фатальные кровотечения, так как некоторые опухоли связаны с многочисленными кровеносными сосудами.

Рак легкого является ведущей причиной смертности в Соединенных Штатах, вызванной заболеванием раком, и одной из ведущих причин смертности во всем мире. За прошедшие 25 лет для больных индивидуумов фактически не изменился показатель полного 5-летнего выживания (приблизительно 13%). После многолетнего резкого увеличения сфера распространения этой болезни, кажется, выравнивается. Курение сигарет - причина приблизительно 90% случаев рака легкого у мужчин и приблизительно 80% случаев у женщин. Чем выше интенсивность и продолжительность курения, тем больше риск

развития рака легкого. Приблизительно у 10-12% всех курильщиков в конечном счете развивается рак легкого.

Первичные карциномы легкого делятся на два главных типа: карцинома немаленьких клеток и карцинома маленьких клеток. Карцинома немаленьких клеток более обычна и имеет лучший прогноз, чем карцинома маленьких клеток. Существуют три главных класса карциномы немаленьких клеток легкого: карцинома сквамозной клетки (названная также эпидермоидной карциномой), аденокарцинома и карцинома большой клетки. Аденокарцинома - самый распространенный тип рака легкого, составляя 30-35% всех случаев.

Прогноз для первичного рака легкого весьма незавидный. Меньше чем один процент индивидуумов, имеющих карциному маленькой клетки, доживают до пяти лет после диагноза болезни. Напротив, прогноз для индивидуумов, имеющих карциному немаленькой клетки зависит от стадийности рака, и конкретно, от присутствия или отсутствия отдаленных метастаз. Отдаленные метастазы связаны с 5-летней нормой выживания менее чем у пяти процентов. Обычным участком для таких метастаз является ткань печени.

В настоящее время карциномы маленькой клетки лечат путем комбинирования хирургической резекции, лучевой терапии и химиотерапии. Несмотря на такое агрессивное лечение прогноз болезни чрезвычайно плохой. Лечение карциномы маленькой клетки легкого включает хирургическую резекцию пораженного злокачественного участка. К сожалению, такие хирургические вмешательства возможны только на самых ранних стадиях болезни, и даже при применении хирургического вмешательства, 5-летняя норма выживания составляет всего 25-40%. Хотя лучевая терапия может быть применена для лечения карциномы немаленькой клетки на более поздних стадиях болезни, однако, прогноз такой терапии плохой. Химиотерапия проявляет ограниченную эффективность относительно карциномы немаленькой клетки, однако может значительно увеличить продолжительность жизни в случае метастатической формы карциномы немаленькой клетки.

Диагноз и обнаружение раковых образований облегчается при применении, среди прочего, обследования грудной клетки рентгеновскими лучами, компьютерной томографии легких, бронхоскопии и биопсии.

Колоректальные карциномы - рак ободочной кишки и ректальные раковые образования являются второй ведущей причиной смерти, обусловленной раком, составляя приблизительно 20% всех смертных случаев рака в Соединенных Штатах. 5-летняя норма выживания составляет приблизительно 63%; отдаленные метастазы сопряжены с намного более низкой нормой выживания, меньше чем 10%. Приблизительно у 60% пациентов, страдающих колоректальным раком, развиваются метастазы печени, для которых золотым терапевтическим стандартом остается резекция печени. Несмотря на хирургическое лечение у большинства пациентов после резекции печени наблюдаются рецидивы и приблизительно пятьдесят процентов этих рецидивов проявляются в пределах печени. Почти все колоректальные раковые образования являются аденокарциномами.

В случае колоректальной карциномы, задержка постановки диагноза значительно влияет на прогноз. В случае раннего обнаружения колоректальный рак часто можно успешно лечить. Таким образом, например, пациенты, опухоль которых ограничена кишечной стеной, как правило, после хирургической резекции имеют превосходный шанс для излечения (пятилетняя норма выживания >95%). Однако, если опухоль простирается на серозную оболочку и брыжеечный жир, пятилетняя норма выживания после резекции снижается до 80%. Метастазы лимфатического узла уменьшают пятилетнюю норму выживания до 40%, в то время как отдаленные метастазы (напр., печени, легкого, кости, мозга) уменьшают пятилетнюю норму выживания до 10% и менее. Поскольку признаки колоректальной карциномы на ранних стадиях болезни часто являются неопределенными и неспецифическими, то в большинстве случаев, обнаружение заболевания задерживается. В результате этого, в течение времени, израсходованного для диагностики, рак настолько развивается, что лечение становится трудным или невозможным. Колоректальные карциномы вообще плохо поддаются химиотерапевтическому лечению. Хотя может быть достигнуто определенное облегчение болезни, однако, как было показано, химиотерапия не способна продлить жизнь пациентов, страдающих колоректальным раком, особенно, когда болезнь распространилась широко.

Профилактическая Целевая группа Услуг США (USPSTF) настоятельно рекомендует, чтобы клиницисты проводили скрининг у мужчин и женщин возраста 50 лет или старше на колоректальный рак. USPSTF нашло прямое доказательство того, что в результате периодического определения скрытой крови в кале (FOBT) уменьшается смертность от колоректального рака, а также явное доказательство того, что сигмоидоскопия, одна или в комбинации с FOBT, уменьшает смертность. Однако, обычно используемые скрининговые тесты на колоректальную карциному могут привести к ложным положительным результатам, а ошибочные отрицательные результаты обследования могут отсрочить обнаружение болезни. Например, FOBT обнаруживает скрытую кровь в кале, а для этого необходимо, чтобы злокачественная опухоль ободочной кишки была развита до стадии кровотечения, обнаружить которую визуально еще невозможно. Сигмоидоскопия требует, чтобы любая колоректальная карцинома была видима, и следовательно, диагностика может быть осложнена присутствием других повреждений типа геморроидаль-

ных узлов, полипов, и проктита. Аналогичные недостатки имеет также и колоноскопия.

Моноклональные антитела («mAbs»), специфические к связанным опухолью антигенам, открывают широкие перспективы в исследовании, диагностике, мониторинге и лечении раковых образований. Однако на пути их широкого применения *in vivo* для лечения человека и других млекопитающих возникают значительные практические проблемы.

Главной проблемой является то, что моноклональные антитела нечеловеческого происхождения часто являются иммуногенными, что ограничивает их эффективность, а в некоторых случаях вызывает опасные аллергические реакции. Большинство mAbs производят из мышей или крыс, а при инъекции в организм человека mAbs в основном оказались иммуногенными. Иммунная реакция в ответ на такие чужеродные mAbs включает выработку определенных, высокоаффинных антител, которые связываются с mAbs и элиминируют их, существенно снижая таким образом эффективность mAbs путем стимулирования их клиренса из организма и ингибирования их способности соединяться со связанным опухолью целевым антигеном.

Известны много методов, которые могут уменьшить иммуногенность нечеловеческих антител. Они включают:

создание химерных антител путем присоединения переменных областей тяжелых и легких цепей нечеловеческого антитела с постоянными областями человеческого антитела, как описано в источниках: Cabilly, et al. in United States Patent No. 4816 567; Morrison, S. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne, G. L. et al., Nature 312: 643-646 (1984); Neuberger, M. S. et al., Nature 314: 268-270 (1985);

создание гуманизированных антител заменой нечеловеческих регионов (CDRs) или CDR-последовательностей, определяющих комплементарность, с соответствующими сегментами человеческого антитела (также известными, как CDR-трансплантаты), как описано в литературе: Winter, United States Patent No. 5225539; Jones, P.T. et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann, L. et al, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven, M. et al., Science 239: 1534-1536 (1988). Это влечет за собой также замену некоторых FR остатков в человеческом антителе остатками аналогичных сайтов нечеловеческого антитела, чтобы сохранить связывающий антиген, напр. как описано в документах Queen, et al., United States Patent №№ 5530101; 5585089; 5693762; 6180370; Carter, et al., United States Patent №№ 6054297; 6407213 и 6639055; Adair, United States Patent № 6632927; Winter, United States Patent № 6548640;

создание гуманизированных антител путем селективного замещения остатков в переменных областях нечеловеческого антитела (которые известны также, как облицованные или вновь покрытые), например, аналогично данным Pedersen, et al., United States Patent № 5639641; Studnicka, et al., United States Patent №№ 5766886 и 5821123; Carr et al., United States Patent Application № 10/300215.

соединение антитела или фрагмента антитела с аутоантигенными последовательностями, которые делают нечеловеческое антитело, или фрагмент антитела менее иммуногенными, как описано в документе Jordan, et al., United States Patent № 6652863.

Число способов создания химерных или гуманизированных антител определяется трудностью, с которой сталкиваются при создании соответствующих представителей этого класса. Обычно оказывается, что созданное антитело имеет слишком низкий аффинитет или слишком низкую специфичность к целевому, связывающему опухоль антигену, все еще выявляя неблагоприятную иммунную реакцию, что слишком трудно выразить в реальных количествах; а также имеет другие неблагоприятные характеристики.

Другой важный вопрос касается связанного опухолью антигена, нацеленного на антитело. Эффективность лечения зависит от специфики антигена к опухоли, ее роли в росте опухоли и ее экспрессии клетками опухоли. Связанный с опухолью антиген может быть широко выражен в нормальных тканях, требуя, таким образом, более высоких, эффективных доз лечения и увеличивая риск нежелательных побочных эффектов. Антиген может быть выражен в опухоли только в низких процентах, только процентом его клеток в любой опухоли. Опухолевые клетки могут только выделить антиген, однако выражать антиген на поверхности клеток опухолевые клетки неспособны, чем осложняется, и даже становится невозможным, процесс наведения при цитостатической терапии. Связывание с антигеном, выраженным на поверхности клетки не приводит к интернализации цитостатического агента в клетку или к желательному ингибированию функции.

Несмотря на эти препятствия после многих попыток было создано лишь небольшое количество моноклональных антител, обладающих регуляторными свойствами. Терапевтические препараты на основе этих антител включают:

Трастузумаб (Herceptin®), гуманизированное моноклональное антитело (mAb), которое связывает рецептор 2 эпидермального фактора роста 2 человека (HER2), таким образом ингибируя пролиферацию опухолевой клетки и перемещение в метастатических раковых образованиях молочной железы, и которое осуществляет сверхэкспрессию HER2. В настоящее время оно рекомендовано для использования отдельно или в комбинации с паклитакселом, химиотерапевтическим агентом для лечения метастатических раковых образований молочной железы, который осуществляет сверхэкспрессию белка HER2. Нег-

ceptin®, который способен осуществить сверхэкспрессию белка HER2, используют в клинической практике для лечения метастатического рака молочной железы, кроме того, изучается возможность его применения в клинической практике для лечения других типов рака, включая такие типы рака, как остеосаркома, рак немаленьких клеток легкого, раковые образования поджелудочной железы, слюнной железы, ободочной кишки, простаты, слизистой оболочки матки и пузыря. Исследована возможность его применения также в конъюгированном виде с цитотоксином, например типа гелданамицина.

Алемтузумаб (Campath®), гуманизированный моAb, который связывает CD52 антиген. В настоящее время оно рекомендовано для лечения рефрактерной хронической лимфоцитарной лейкемии В-клеток и исследуется возможность его использования для лечения других хронических лимфоцитарных и хронических миелогенных лейкозов.

Гемтузумаб (Mylotarg®), гуманизированный моAb, который связывает CD33, который является белком, выраженным приблизительно в 90% случаев острой миелоидной лейкемией (AML). Mylotarg® конъюгируется с бактериальным токсином, каличемицином, который индуцирует разрывы нити ДНК и апоптоз клеток. Препарат рекомендуется для лечения AML.

Ритуксимаб (Rituxan®), химерный моAb, который связывает CD20, антиген, найденный на поверхности зрелых В-клеток, маркируя таким образом клетки для разрушения иммунной системой организма. Оно рекомендовано для лечения рецидивной или рефрактерной, слабо выраженной не-Ходжкиновой лимфомы (NHL) фолликулярных В-клеток. Исследуется также возможность использования этого препарата для лечения лимфомы В-клеток и хронической лимфоцитарной лейкемии.

Ибритумомаб (Zevalin®), крысиный моAb, который конъюгирован с испускающим бета-лучи радиоизотопом, Иттрием-90 (90Y), и тоже связывает CD20 и вызывает повреждение целевых и соседних клеток. Этот препарат в комбинации с Rituxan®-ом рекомендован для лечения NHL.

Тоситумомаб (Bexxar®), крысиный моAb, который также связывает CD20 и конъюгирован с другим радиоизотопом, Йодом 131 (¹³¹I). Этот препарат предназначен для лечения рецидивных NHL после химиотерапии препаратом Rituxan®commat.

Эдреколомаб (Panorex®), крысиный моAb, который связывает эпителиальную молекулу адгезии клетки. В Европе этот препарат рекомендован для лечения рака кишечника, а в США - для лечения рака кишечника и молочной железы в Стадии III.

Другие терапевтические антитела, используемые при лечении рака стадии III, включают:

Цетуксимаб (Erbix®), химерный моAb, который связывает эпидермальный рецептор фактора роста (EGFR), и исследуется возможность его применения для лечения раковых образований головы и шеи, рака немаленьких клеток легкого, рака кишечника, рака молочной железы и раковых образований поджелудочной железы и простаты.

Бевацизумаб (Avastin®commat), гуманизированный моAb, который связывает сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF); исследуется возможность применения этого препарата для лечения метастатического рака кишечника, рака молочной железы и рака немаленьких клеток легкого.

Гуманизированные антитела и фрагменты антитела используются также для генерации поколения новых оптимизированных терапевтических препаратов путем применения методов, разработанных для улучшения параметров и эффективности этих препаратов, типа визуализации фара, визуализации поверхности бактериальных или дрожжевых клеток (напр. Kieck, et al., United States Patent № 6300065; Wittrup, et al., United States Patent № 6423538), и другие направленные молекулярные технологии развития (напр. Co, et al., United States Patent № 5714350).

Химерные и гуманизированные антитела и фрагменты антитела используются также для диагностики, организации и мониторинга лечения рака. Высокий в естественных условиях период полувыведения и низкая иммуногенность делают моAbs потенциально более пригодными для иммунной визуализации in vivo, где обнаруживаемая метка, типа радионуклида или агента-индикатора резонанса, конъюгирована с фрагментом антитела или с антителом. Такие антитела и фрагменты антитела используются также для решения вопроса, выражает ли опухоль антиген перед последующим лечением, определяя сайты для локального введения антитела и контролируя рецидивы после лечения. Подобно другим антителам, такие антитела применяются также в иммуногистологии и иммунологических обследованиях.

Ассоциированный с опухолью AF-20 антиген является локализованным на поверхности клетки, быстро усваиваемым гомодимерным гликопротеином, с молекулярной массой 180 кДа, который в избытке выражен в клетках человеческой гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), так же, как и в клетках отдаленных метастаз, типа аденокарциномы клеток легкого и карциномы клеток кишечника. AF-20 антиген был найден при помощи крысиного моноклонального антитела с высоким сродством (AF-20 моAb), обнаруженного путем иммунизации мышей линией клеток гепатоцеллюлярной карциномы FOCUS и скрининга гибридом активности антитела на панели линий клеток. Было установлено, что AF-20 антиген не выражен в нормальной ткани печени, смежной с HCC тканью, ни в других нормальных тканях, за исключением надпочечника. Слабая экспрессия AF-20 антигена была обнаружена у субпопуляции клеток клубочковой зоны надпочечника и у криптовых клеток тракта тонких кишок. (См. Wands, et al., United States Patent № 5703213; Wilson et al., "Cell-surface changes associated with transformation of human hepatocytes to the

malignant phenotype (Изменения поверхности клетки, связанные с трансформацией гепатоцитов человека в злокачественный фенотип)," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988, 85: 3140-4); Takahashi et al., "In vivo expression of two novel tumor-associated antigens and their use in immunolocalization of human hepatocellular carcinoma (In vivo экспрессия связанных с опухолью двух новых антигенов и их применение в иммунолокализации гепатоцеллюлярной карциномы человека)," *Hepatology* (1989; 9: 625-34); Moradpour et al., "Specific targeting of human hepatocellular carcinoma cells by immunoliposomes in vitro (Специфическое нацеливание на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека иммунолипосомами in vitro)," *Hepatology* (1995; 22: 1527-37); Wands et al., "Immunological approach to hepatocellular carcinoma (Иммунологический подход к гепатоцеллюлярной карциноме)," *J. Viral Hepat.* (1997; 4 Suppl 2: 60-74); Mohr et al., "Targeted gene transfer to hepatocellular carcinoma cells in vitro using a novel monoclonal antibody-based gene delivery system (Перенос нацеленного гена в клетках гепатоцеллюлярной карциномы in vitro, с использованием новой моноклональной системы поставки гена на основе антитела)," *Hepatology* (1999; 29: 82-9); Yoon et al., "Targeting a recombinant adenovirus vector to HCC cells using a bifunctional Fab-antibody conjugate (Нацеливание рекомбинантного аденовирусного вектора на клетки HCC с использованием бифункционального конъюгата Fab-антитела)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2000; 272: 497-504); Palumbo et al., "Human aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase monoclonal antibodies: potential biomarkers for pancreatic carcinoma (Человеческие моноклональные антитела - аспартил (аспарагинил) бета-гидроксилазы: потенциальные биомаркеры для карциномы поджелудочной железы)," *Pancreas* (2002; 25: 39-44); Yoon et al., "Targeted cancer therapy using chimeric immunotoxin of AF-20 monoclonal antibody with *Pseudomonas* exotoxin for hepatocellular carcinoma (Целенаправленная терапия рака с использованием химерного иммунотоксина AF-20 моноклонального антитела, с экзотоксином *Pseudomonas*, для гепатоцеллюлярной карциномы)," (неопубликованное резюме, июнь 2002); раскрытия которых здесь включены в виде ссылок.

AF-20 moAb обладает потенциалом как иммунного нацеливающего агента, так и иммунного визуализирующего агента. Радиоактивно меченный AF-20 moAb был использован, однако, менее успешно, в модельных опытах на голых мышах для радиовизуализации in vivo, с целью локализации обусловленной вирусом гепатита В гепатоцеллюлярной карциномы линии клеток (FOCUS), выращенной в виде подкожных опухолей. Исследования методом ядерной визуализации показали острую визуализацию опухолевой ткани, демонстрируя хорошую специфику и чувствительность AF-20 moAb, как потенциального иммунного нацеливающего агента или иммунного визуализирующего агента.

Было обнаружено, что AF-20 moAb быстро усваивается клетками HCC, что обуславливает возможность его использования для целевой поставки цитостатического агента или препарата генной терапии к опухолевым клеткам, которые выражают AF-20 антиген. Антитела связанных опухолью антигенов, которые не способны усваиваться связывающими их опухолевыми клетками, вообще не пригодны для такой целевой поставки, так как они не способны достигнуть сайта их действия в пределах клетки. В одном исследовании (Yoon 2002, выше), было установлено, что AF-20 moAb, конъюгированный с экзотоксином *Pseudomonas*, проявляет мощную противоопухолевую активность в клетках HCC in vitro и в HCC трансплантатах in vivo в экспериментах с голыми мышами. В другом подходе (Moradpour, выше), AF-20 moAb был ковалентно связан с липосомами, содержащими карбоксифлюоресцеин. AF-20-иммунолипосомы, которые специфически связаны с HCC и с другими линиями раковых клеток человека, выражающих AF-20 антиген, быстро усваиваются при 37°C. Взаимодействие AF-20-конъюгированных липосом с этими линиями клеток было в 5-200 раз интенсивнее, чем у неконъюгированных липосом, тогда как не было обнаружено никакого различия между контрольными липосомами, имеющими нерелевантное антитело и неконъюгированными липосомами. Кинетический анализ показал быструю ассоциацию AF-20-иммунолипосом с целевыми клетками в условиях насыщенности, которые достигались через 60 мин.

AF-20 moAb был использован также для развития системы поставки экспериментально нацеленного гена. В одном таком подходе определенная аденовирусная система поставки гена, состоящая из бифункционального конъюгата Fab-антитела (2Hx-2-AF-20), была генерирована путем сшивания AF-20 moAb с анти-гексоном Fab-фрагмента антитела. Оказалось, что конъюгированный комплекс быстро усваивался при 37°C, а высокие уровни экспрессии репортерного гена наблюдались в позитивных к AF-20 антигену HCC клетках, но не в негативных к AF-20 антигену контрольных HCC клетках. В другом подходе, AF-20 moAb был конъюгирован со связывающим ДНК катионным амфифильным веществом, холестерил-спермином, для поставки гена клеткам гепатоцеллюлярной карциномы (HCC). Закрепление и интернализация AF-20-холестерил-спермина была подтверждена флюоресцентной микроскопией, с использованием анти-мышинного IgG антитела, помеченного флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC). Трансфекция комплексов репортерного гена люциферазы или бета-галактозидазы и AF-20-холестерил-спермина привела к высоким уровням экспрессии гена в AF-20-антиген-положительных клетках опухоли.

Приведенное выше обсуждение подтверждает неотложную потребность в улучшенных методах лечения рака, особенно гепатоцеллюлярной карциномы, аденокарциномы легкого и карциномы кишечника. Крысиное моноклональное антитело, AF-20 moAb, предположительно является потенциальным средством для целенаправленной поставки терапевтических препаратов к этим опухолям и их метастазам, однако, чтобы быть более эффективным, необходимо уменьшить его иммуногенность, или, что предпочтительнее, полностью исключить иммуногенность. Соответственно, необходимо создать производные AF-

20 моАb химерные и гуманизированные антитела, которые сохраняют их аффинитет и специфичность к AF-20 антигену.

Описанные здесь недостатки и вредные свойства, связанные с известными композициями, методами и системами, никоим образом не ограничивают объем данного изобретения. Действительно, чтобы избежать известных недостатков и проявления вредных свойств, в осуществлениях данного изобретения могут быть включены части одного или более известных композиций, методов и систем.

Обзор осуществлений

Осуществления этого изобретения удалось выполнить в результате неожиданного открытия и создания химерных и гуманизированных антител, которые сохраняют положительный аффинитет к AF-20 и дают возможность разработать новый подход в области лечения по крайней мере трех основных разрушительных раковых образований.

Одно из осуществлений данного изобретения охватывает химерные и гуманизированные антитела и их фрагменты, способные распознавать AF-20 антиген, связанный с гепатоцеллюлярной карциномой, аденокарциномой легкого, карциномой кишечника и с другими раковыми образованиями («AF-20 антитела»). Предпочтительное осуществление этого изобретения касается химерного антитела и гуманизированного антитела, описанных здесь, включая последовательности VRs, FRs и CDRs полипептидов и кодирующих их полинуклеотидов.

Другое осуществление изобретения охватывает VR, FR и CDR полипептиды описанных здесь нечеловеческих AF-20 антител и гуманизированных AF-20 антител («VRs, FRs и CDRs») и кодирующие их полинуклеотиды, а также использование этих полинуклеотидов и полипептидов для создания новых антител и полипептидных композиций, способных распознавать AF-20 антиген.

Дополнительное осуществление данного изобретения описывает полинуклеотиды, кодирующие полипептиды VRs, FRs и CDRs антитела AF-20.

Описаны также различные векторы экспрессии, включающие полинуклеотиды, кодирующие антитела AF-20 и полипептиды VRs, FRs и CDRs, действующим образом связанные с промоторными последовательностями. Аналогичным образом, другое осуществление этого изобретения рассматривает клетки хозяина, трансформированные с помощью векторов экспрессии, для экспрессии AF-20 антител, VRs, FRs и CDRs.

Осуществления этого изобретения описывают также применение AF-20 антител для диагноза, оценки и лечения гепатоцеллюлярной карциномы, аденокарциномы легкого, карциномы кишечника и других раковых образований, которые выражают AF-20 антиген. Дополнительные осуществления данного изобретения касаются использования таких антител в качестве систем для целенаправленной поставки цитостатических агентов типа химиотерапевтических лекарств, пептидов или радионуклидов, для промоторов иммунологических реакций типа цитокинов, для пролекарств или для генной терапии.

Другое осуществление этого изобретения касается использования гуманизированных AF-20 антител, и их VRs, FRs и CDRs, для развития направленных молекулярных технологий, типа технологии визуализации фага, или технологии визуализации поверхности бактериальных или дрожжевых клеток, с целью генерации полипептидов с повышенным аффинитетом, специфичностью, стабильностью или другими желательными показателями.

Другие цели, особенности и характеристики данного изобретения станут очевидными после рассмотрения следующего описания и прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает ДНК (SEQ ID NO: 1) и аминокислотную последовательность (SEQ ID NOS: 2 и 3, соответственно, в порядке появления);

фиг. 2 - ДНК (SEQ ID NO: 4) и аминокислотную последовательность (SEQ ID NOS: 5 и 6, соответственно, в порядке появления) NYR-1002 переменной легкой цепи, вместе с идентифицированными в ней четыремя FRs и тремя CDRs;

фиг. 3 - вектор экспрессии тяжелой цепи антитела;

фиг. 4 - вектор экспрессии легкой цепи антитела;

фиг. 5 - потенциальные эпитопы Т клеток человека, идентифицированные в тяжелых и легких переменных областях NYR-1002 (SEQ ID NOS: 7-23, соответственно, в порядке появления);

фиг. 6 - замены аминокислот и потенциальные эпитопы, созданные в вариантах областей V_H NYR-1002, табл. 2 показывает SEQ ID NOS: 24-31, соответственно, в порядке появления);

фиг. 7 - замены аминокислот и потенциальные эпитопы, созданные в вариантах областей V_L NYR-1002, табл. 2 показывает SEQ ID NOS: 32-37, соответственно, в порядке появления);

фиг. 8 - ДНК (SEQ ID NO: 38) и аминокислотную последовательность (SEQ ID NOS: 39 и 40, соответственно, в порядке появления) первичного NYDIV_H1;

фиг. 9 - ДНК (SEQ ID NO: 41) и аминокислотную последовательность (SEQ ID NOS: 42 и 43, соответственно, в порядке появления) варианта V_L первичного NYR-1002, NYDIV_L1;

фиг. 10 - показывает полученные модифицированные антитела и выход очищенного белка А антитела из 1 л супернатанта культуры;

фиг. 11 - реакция 20 доноров к антителу NYDIV_H2/NYDIV_L2 и крысиному антителу NYR-1002 при

анализах Т клеток человека.

Детальное описание

В общих чертах, используемые в описании, примерах и формуле изобретения, слова или фразы имеют следующие определения.

Выражения «AF-20» или «AF-20 антиген» относятся к антигену клеток аденокарциномы, описанному в Патенте США № 5703213, раскрытие которого полностью включено здесь в виде ссылки, и который способен связываться с крысиным антителом, произведенным линией клеток гибридомы, депонированной Американской Коллекцией Типов Культур (АТСС) согласно Будапештскому Договору от 12 апреля 1988, и зарегистрированной под депозитным инвентарным номером АТСС № HB 9687.

Используемый здесь термин, «АТСС» означает Американскую Коллекцию Типов Культур (АТСС), расположенную по адресу 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, 20110-2209, USA. «NYR-1002» относится к крысиному антителу, произведенному линией клеток гибридомы, обозначенной АТСС HB 9687.

Выражение «постоянная область» или «CR» относится к постоянным областям антитела, которые непосредственно не вовлечены в связывании антитела с антигеном, однако они вовлечены в различные эффекторные функции, типа участия антитела в зависимую от антитела клеточную цитотоксичность.

Общая структура антител позвоночных животных к настоящему времени хорошо исследована (Edelman, G. M., Ann. N. Y. Acad. Sci., 190: 5 (1971)). Антитела состоят из двух идентичных легких цепей полипептида с молекулярным весом приблизительно 23000 Да («легкая цепь») и двух идентичных тяжелых цепей с молекулярным весом 53000-70000 Да («тяжелая цепь»). Эти четыре цепи связаны между собой дисульфидными связями «Y» конфигурации, где легкие цепи, начиная с открытого конца «Y» конфигурации, заключают в скобки тяжелые цепи. «Разветвленная часть» «Y» конфигурации определяется, как Fab область; стебельная часть «Y» конфигурации определяется как Fc область. Ориентация аминокислотной последовательности направлена от конца N-терминала через верхний конец «Y» конфигурации к концу C-терминала у основания каждой цепи. Конец N-терминала содержит переменную область, специфическую для выявляющего ее антигена; длина этой области приблизительно 100 аминокислот, и наблюдаются незначительные вариации между легкой и тяжелой цепью, которые изменяются в зависимости от антитела.

Переменная область связана в каждой цепи с постоянной областью, которая простирается до конца остающейся длины цепи, и которая в пределах специфического класса антитела не изменяется в зависимости от специфичности антитела (т.е. выявляющего ее антигена). Известны пять главных классов постоянных областей, которые определяют класс молекулы иммуноглобулина (IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, которые соответствуют γ , μ , α , δ и ϵ (гамма, мю, альфа, дельта и эпсилон) постоянным областям тяжелой цепи). Постоянная область или класс определяет последующую эффекторную функцию антитела, включая активацию комплемента (Kabat, E. A., Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry (Структурные концепции в иммунологии и иммунохимии), 2-е изд. стр. 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976)), и другие клеточные ответные реакции (Andrews, D. W., et al., Clinical Immunobiology (Клиническая иммунобиология), с. 1-18, W. B. Sanders (1980); Kohl, S., et al., Immunology, 48: 187 (1983)); в то время как переменная область определяет антиген, с которым она будет реагировать. Легкие цепи классифицируются, как κ (каппа) или λ (лямбда). Каждый тяжелый класс цепи может быть приготовлен с легкой цепью каппа или лямбда. Если иммуноглобулины генерированы гибридами или В клетками, то легкие и тяжелые цепи являются ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентной дисульфидной связью.

Выражение «переменная область» или «VR» относится к областям в пределах каждой пары легких и тяжелых цепей в антителе, которые непосредственно вовлечены в связывании антитела с антигеном. Каждая тяжелая цепь имеет в одном конце переменную область (VH), которая сопровождается множеством постоянных областей. Каждая легкая цепь имеет переменную область (VL) в одном конце и постоянную область в ее другом конце; постоянная область легкой цепи сориентирована относительно первой постоянной области тяжелой цепи, а легкая область переменной цепи сориентирована относительно переменной области тяжелой цепи.

Выражения «область, определяющая комплементарность», «гиперпеременная область», или «CDR» относятся к одной или более гиперпеременных областей или областей, определяющих комплементарность (CDRs), найденных в переменных областях легких или тяжелых цепей антитела (См., Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Последовательности иммунологически важных белков), National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Эти выражения включают гиперпеременные области, как определено у Kabat и соавторов («Sequences of Proteins of Immunological Interest (Последовательности иммунологически важных белков)» Kabat E., et al., US Dept. of Health and Human Services, 1983), или гиперпеременных петель в 3-мерных структурах антител (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196 901-917 (1987)). В каждой цепи, CDRs расположены в непосредственной близости с областями каркаса и совместно с CDRs от другой цепи участвуют в формировании связывающего антиген участка.

Выражения «область каркаса» или «FR» относятся к одной или более областей каркаса в пределах

переменных областей легких и тяжелых цепей антитела (См., Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Последовательности иммунологически важных белков), National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Эти выражения включают те области последовательностей аминокислот, которые помещены между CDRs в пределах переменных областей легких и тяжелых цепей антитела.

Остатки CDR и FR определяются по стандартным методикам определения последовательности (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Последовательности иммунологически важных белков), National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987), и определения структуры (Chothia и Lesk, J. *Mol. Biol.* 196: 901-217 (1987)), где результаты идентификации CDR по этим двум методикам немного отличаются друг от друга; предпочтительным является структурная идентификация, однако, идентификация FR-остатков методом определения последовательности считается важным для определения каркасных остатков, импортируемых в консенсусную последовательность.

Всюду в этом описании сделана ссылка на схему нумерации по Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Последовательности иммунологически важных белков), National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987) и (1991). В этих рефератах Кабат приводит список большого числа аминокислотных последовательностей для антител каждого подкласса и вносит в список наиболее часто встречающуюся аминокислоту для позиции каждого остатка в данном подклассе. Кабат использует эту систему для обозначения номера остатка каждой аминокислоты во внесенной в список последовательности, и этот метод обозначения номера остатка стал общепринятым в данной области. Предложенная Кабатом схема нумерации использована также и в данном описании.

Для целей этого изобретения, если нумерация остатков аминокислотной последовательности антитела-кандидата не включена в реферат Кабата, поступают следующим образом. Вообще, последовательность кандидата выровнена относительно любой последовательности иммуноглобулина или любой консенсусной последовательности в системе Кабата. Выравнивание может быть выполнено вручную, или компьютером, с использованием обычно применяемых компьютерных программ. Выравнивание может быть облегчено, используя некоторые остатки аминокислот, которые являются характерными для большинства Fab-последовательностей. Например, легкие и тяжелые цепи, каждая обычно имеет два цистеина, которые имеют те же самые номера остатка; в VL области эти два цистеина обычно имеют номера остатка 23 и 88, а в VH области два остатка цистеина обычно пронумерованы как 22 и 92.

Остатки каркаса вообще, но не всегда, имеют приблизительно те же самые номера остатков, однако CDRs отличаются по размеру. Например, в случае CDR от последовательности-кандидата, которая более длинна, чем CDR в последовательности Кабата, по которой она выровнена, обычно к номеру остатка добавляются суффиксы, чтобы указать вставку дополнительных остатков. Для последовательностей-кандидатов, которые, например, выровнены с последовательностью Кабата для остатков 34 и 36 и между ними нет никакого остатка, чтобы выровнять к остатку 35, номер 35 просто не обозначен как остаток.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и определенно охватывает отдельные моноклональные антитела (включая антитела-агонисты и антитела-антагонисты) и композиционные антитела с полиэпитопной спецификой. Термин «антитело» включает также очевидные варианты, производные, аналоги, фрагменты, миметики, которые существенно сохраняют связывающие свойства и другие свойства указанного антитела.

Выражение «моноклональное антитело» (moAb), как используется здесь, относится к антителу, полученному от популяции существенно гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела этой популяции идентичны, за исключением возможных естественно встречающихся мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела, будучи направленными против отдельной эпитопной области антигена, являются высокоспецифическими. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антитела, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминантов (эпитопов), каждый moAb направлен против отдельного детерминанта на антигене. В дополнение к их специфичности моноклональные антитела предпочтительны тем, что они могут синтезироваться культурой гибридомы, незагрязненной другими иммуноглобулинами.

Модификатор «моноклональный» указывает характер антитела, как получаемого от существенно гомогенной популяции антител, и не конструированного никакими специфическими методами по требованию производства. Например, используемые в соответствии с данным изобретением моноклональные антитела могут быть получены методом гибридомы, впервые описанным Kohler и соавторами., *Nature*, 256: 495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., напр., US. Pat. № 4816567, выданный Cabilly et al.). «Моноклональные антитела» включают также клоны антител, содержащих фрагменты узнавания антигена и связывающего участка (Fv клоны), изолированные из библиотек фаг-антител, используя методы, описанные, например, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

«Фрагмент антитела» и все грамматические варианты этого термина, используемые здесь, определяются как часть неповрежденного антитела, включающего антигенсвязывающий участок или переменную область интактного антитела, где указанная часть свободна от постоянных тяжелых областей цепи (т.е., CH2, CH3, и CH4, в зависимости от изотипа антитела) Fc области интактного антитела; промежу-

точные тела. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, и Fv фрагменты; промежуточные тела; любой фрагмент антитела, который является полипептидом, имеющим первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности смежных аминокислотных остатков (обозначенной здесь как «однонитевой фрагмент антитела» или «однонитевой полипептид»), включая без ограничения (1) однонитевые Fv (scFv) молекулы; (2) однонитевые полипептиды, содержащие только одну переменную область легкой цепи или их фрагмент, который содержит три CDRs переменной области легкой цепи, без ассоциированной части тяжелой цепи; и (3) однонитевые полипептиды, содержащие только одну тяжелую область переменной цепи или их фрагмент, который содержит три CDRs переменной области легкой цепи, без ассоциированной части легкой цепи. Описанные в этом изобретении фрагменты антитела далее охватывают мультиспецифические или мультивалентные структуры, сформированные из вышеупомянутых фрагментов антитела. Во фрагменте антитела, включающем одну или более тяжелых цепей, тяжелая цепь (тяжелые цепи) могут содержать любую единицу из следующих:

одна или более постоянных областей последовательности (напр., CH1 в изоформе IgG) найденной в не-Fc области интактного антитела, и/или

любая шарнирная область последовательности, найденной в интактном антителе, и/или

лейциновая застежка последовательности, слитая с шарнирной областью последовательности или расположенная в шарнирной области последовательности, или в области тяжелой цепи (тяжелых цепей) постоянной последовательности. Подходящие лейциновые застежки последовательности включают jun и fos лейциновые застежки, описанные Kostelney et al., J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992) и GCN4 лейциновую застежку, описанную в примерах ниже.

Выражение «химерное антитело» относится к полипептиду, включающему переменную область нечеловеческого антитела, которое связывает AF-20, соединенный, по крайней мере, с другой частью другого белка, предпочтительно с постоянной областью человеческого антитела.

Термин «гуманизированный», поскольку это принадлежит "гуманизированному" антителу, относится к полипептиду, включающему измененную переменную область человеческого антитела, где часть переменной области, предпочтительно часть существенно меньшая, чем интактная человеческая переменная область, заменена соответствующей последовательностью нечеловеческого вида и где измененная переменная область связана, по крайней мере, с другой частью другого белка, предпочтительно с постоянной областью человеческого антитела. Выражение «гуманизированные антитела» включает человеческие антитела, в которых некоторые или все остатки CDR и/или возможно, некоторые FR остатки, заменены остатками аналогичных участков антител грызуна или других нечеловеческих антител, которые способны связывать AF-20 антиген. Выражение «гуманизированное антитело» включает также вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагментов, которые способны связывать AF-20 антиген, и это включает FR область, имеющую существенно аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющего существенно аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина.

Вообще, гуманизированное антитело существенно включает по крайней мере одну, а более предпочтительно две переменные области (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) где все, или существенно все области CDR соответствуют таковым из нечеловеческого иммуноглобулина и все или существенно все FR области соответствуют таковым из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Оптимально гуманизированное антитело также включает по крайней мере часть постоянной области иммуноглобулина (Fc), которая характерна для человеческого иммуноглобулина. Обычно антитело содержит обе легкие цепи, а также, по крайней мере, переменную область тяжелой цепи. Антитело также может включить CH1, шарнир, CH2, CH3, и CH4 области тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть отобрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любой изотип, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Обычно постоянная область - эта фиксирующая компонент постоянная область, где желательно, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитостатическую деятельность, а класс иммуноглобулина - обычно IgG и предпочтительно IgG1. Если такая цитостатическая активность нежелательна, то постоянная область может быть IgG2 класса. Гуманизированное антитело может включить последовательности от более чем одного класса или изотипа, а отбор специфических постоянных областей для оптимизации желательных эффекторных функций, несложная задача для рядового специалиста. FR и CDR области гуманизированного антитела не должны точно соответствовать родительским последовательностям, например, импортный CDR или консенсус-FR могут быть мутированы замещением, вставкой или делецией одного или более остатков, таким образом, чтобы CDR или FR-остаток на том участке не соответствовали консенсусному или импортному антителу. Такие мутации, однако, не будут экстенсивными и не будут резко влиять на связывание антитела со связывающей мишенью.

Выражение «гуманизированное антитело» также включает гибридные и рекомбинантные антитела и полипептиды, произведенные путем сплайсинга переменной области или одного или более CDRs анти-AF-20 антитела, с любым гетерологичным белком (белками), независимо от вида происхождения, типа белка, класса иммуноглобулина или наименования подкласса, пока гибридные и рекомбинантные антитела и полипептиды проявляют желательную биологическую эффективность.

Выражение «гуманизированное антитело» далее включает антитела и полипептиды, оказавшиеся неиммуногенными, или проявляющие низкую иммуногенность относительно нативного антитела по отношению к человеку; иммуногенность определяется методом анализа по крайней мере части аминокислотной последовательности антитела или полипептида (предпочтительно, части нечеловеческого происхождения, типа V_H или V_K области нечеловеческого антитела), идентифицируя в аминокислотной последовательности один или более потенциальных эпитопов для человеческих Т-клеток и модифицируя аминокислотную последовательность (последовательности) одного или более эпитопов, чтобы элиминировать по крайней мере одну из идентифицированных эпитопов Т-клеток с целью элиминирования или уменьшения иммуногенности белка или его частей, когда они подвергаются воздействию иммунной системы человека. При создании гуманизированного антитела, предпочтительно приблизительно 75%, более предпочтительно приблизительно 90%, и наиболее предпочтительно больше чем приблизительно 95% гуманизированных остатков антитела должны соответствовать таковым из родительских FR и CDR последовательностей.

Фраза «эпитопы Т-клеток» относится к определенным пептидным последовательностям, которые с определенной эффективностью связываются с молекулами МНС класса II, или которые на основе предыдущих или других исследований проявляют способность стимулировать Т-клетки через презентацию молекул МНГ класса II. Однако понятно, что не все такие пептидные последовательности будут поставляться в соответствующий клеточный компартмент МНС класса II, для связывания с МНС класса II, или соответственно, будут выделяться из более крупного клеточного белка, для последующего связывания с МНС класса II. Также понятно, что даже такие пептиды, которые представлены МНС классом II на поверхности представляющих антиген клеток, будут вызывать ответную реакцию Т-клетки по определенным причинам, включая недостаток соответствующей Т-клеточной специфичности и толерантность иммунной системы к конкретной последовательности пептида.

Выражение «бифункциональное антитело» относится к антителу, которое имеет одно плечо, специфическое для одного антигенного участка типа опухоли, ассоциированной с антигеном, в то время как другое плечо распознает различную цель, например гаптен, который связан или свяжется с агентом, летальным для опухолевых клеток, содержащих антиген. Альтернативно, бифункциональное антитело может быть таким, у которого каждое плечо имеет специфику для различного эпитопа опухоли, ассоциированного с антигеном клетки, которая должна терапевтически или биологически модифицирована. В любом случае, гибридные антитела имеют двойную специфику, которая обусловлена предпочтительно одним или более связывающими участками, специфичными для гаптена выбора, или одним или более обязательными участками, специфичными для целевого антигена, например антигена, связанного с опухолью, инфицирующим организмом или другим болезненным состоянием.

Биологические бифункциональные антитела описаны, например, в заявке на Европейский патент ЕРА 0105360, с которой могут ознакомиться специалисты. Такие гибридные или бифункциональные антитела могут быть получены, как отмечено выше, биологически, методами слияния клеток, или химически, особенно с помощью сшивающих агентов или реагентов, образующих дисульфидные мостики, и могут состоять из таких антител и/или их фрагментов. Описаны методы получения таких гибридных антител, например, в International Publication No. WO83/03679, опубликована Oct. 27, 1983, и European Patent Application ЕРА 0217577, опубликована Apr. 8, 1987; оба источника включены сюда полностью в виде ссылок. Особенно предпочтительны бифункциональные антитела, которые получены биологически, подготовлены из «полидомы» или «квадромы» или получены искусственно, с помощью сшивающих агентов, типа бис-(maleimido)метилового эфира («ВММЕ»), или с помощью других сшивающих агентов, известных специалистам.

Термин «конъюгированный» означает, что одна молекула соединяется непосредственно или косвенно с другой молекулой разнообразными средствами, напр., ковалентной связью, нековалентной связью, ионной связью или неионогенной связью. Ковалентное связывание включает соединение различными линкерами, типа тиоэфирных линкеров или тиоэфирных линкеров. Прямое сопряжение включает связывание одной молекулы другой молекулой, представляющей интерес. Косвенное сопряжение включает связывание одной молекулы другой молекулой, не представляющей интерес, которая действует как мост и в свою очередь соединяется непосредственно или косвенно с молекулой, представляющей интерес.

Выражение «цитостатический агент» означает любой агент, который является вредным для клеток. Примеры включают антиметаболиты типа метотрексата, аминоптерина, 6-меркаптопурина, 6-тиогуанина, цитарабина, 5-фторурацил-декарбамина; алкилирующих агентов типа мехлоретамина, тиоэпа-хлорамбуцила, мелфалана, кармустина (BSNU), митомицина С, ломустина (CCNU), 1-метилнитрозомочевины, циклофосфамида, мехлорэтамина, бусульфана, дибромманнитола, стрептозоточина, митомицина С, цис-дихлордиамин-платины (II) (DDP) цисплатины и карбоплатины (параплатины); антрациклинов, включающих даунорубицин (прежде дауномицин), доксорубицин (адриамицин), деторубицин, карминомицин, идарубицин, эпирубицин, митоксантрон и бисантрон; антибиотиков, включающих дактиномицин (актиномицин D), блеомицин, калихеамицин, митрамицин, и антрамицин (АМС); и антимитозных агентов, типа алкалоидов барвинка, винкристина и винбластина. Другие цитостатические

агенты включают паклитаксел (таксол), ризин, экзотоксин из *pseudomonas*, гемцитабин, цитохалазин В, грамицидин D, этидиум-бромид, эметин, этопозид, тенопозид, колхицин, дигидрокси-антрацендион, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, ксикаин, пропранолол, пуромицин, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, митотан (O,P'-(DDD)), интерфероны и смеси этих цитостатических агентов.

В особенно предпочтительном осуществлении цитостатические агенты включают один или больше пептидов NTP, описанных в U. S. application serial №№ 10/153,334, 10/198,070, 10/198,069, и 10/294,891, которые включены сюда полностью в виде ссылок. Этот пептид NTP, фрагменты пептида NTP, и т.п., могут быть конъюгированы с описанными здесь гуманизированными антителами, чтобы стимулировать некроз опухолевых клеток.

Используемый здесь термин «олигонуклеотиды» обозначает одонитевые или двунитевые деоксинуклеотиды короткой длины, которые химически синтезируются известными методами (типа методов химии фосфотриэфиров, фосфатов или фосфорамидинов, используя методы твердофазного синтеза, описанные в EP 266,032, опубликованном 4 мая, 1988, или синтез через деоксинуклеозид-Н-фосфонатные промежуточные продукты, как описано у Froehler et al., Nucl. Acids Res., 14: 5399-2407 (1986)). После этого их очищают путем хроматографии на полиакриламидных гелях.

Техника «реакции цепи полимеразы», или «PCR», как это используется здесь, вообще относится к процедуре, где следовые количества специфической части нуклеиновой кислоты, РНК и/или ДНК, амплифицированы, как описано в US. Pat. № 4683195 выданном Jul. 28, 1987. Вообще, если доступна информация о последовательностях конечных областей цепей, то могут быть разработаны соответствующие олигонуклеотидные праймеры. По последовательностям, праймеры могут быть идентичными или аналогичными противоположным нитям амплифицируемой матрицы. 5'-терминальные нуклеотиды этих двух праймеров могут совпасть с концами амплифицированного материала. PCR может использоваться для усиления специфических последовательностей РНК, специфических последовательностей ДНК из полной геномной ДНК, и кДНК, транскрибированного из полной клеточной РНК, бактериофага или последовательностей плазмид и т.д. Вообще см., Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); редактор Erlich, PCR Technology (PCR технология), (Stockton Press, N. Y., 1989). Используемая здесь аббревиатура PCR является одним, но не единственным примером метода полимеразы нуклеиновой кислоты, для амплификации пробы для анализа нуклеиновой кислоты, которая включает использование известной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в качестве праймера и использование полимеразы нуклеиновой кислоты, для амплификации или генерации специфической части нуклеиновой кислоты, которая является комплементарным для конкретной нуклеиновой кислоты.

Использованный здесь термин «лечение» обозначает как терапевтическое лечение, так и профилактические или предупредительные меры. Индивидуумы, которым необходимо лечение, включают как уже страдающих от болезни, так и склонных к этой болезни, а также тех, которым требуются профилактические меры.

Особенности описанных здесь осуществлений касаются гуманизированных и химерных антител, фрагментов, полипептидов или их производных, которые способны связывать AF-20 антиген клетки аденокарциномы, который ассоциирован с клетками карциномы, особенно с клетками гепатокарциномы и клетками аденокарциномы ободочной кишки и легкого. Более определенно, эти осуществления касаются гуманизированных и химерных антител, фрагментов, полипептидов или их производных, полученных из крысиного моноклонального антитела, которое произведено линией клеток гибридомы ATCC, обозначенной HB 9687 или другими нечеловеческими антителами, которые специфически связывают AF-20. Описанные здесь осуществления также касаются последовательностей нуклеиновых кислот, которые выражают гуманизированные и химерные антитела данного изобретения, фрагменты, полипептиды или их производные, методы получения таких гуманизированных и химерных антител, фрагментов, полипептидов и их производных, специфических к AF-20, методы использования таких гуманизированных и химерных антител, фрагментов, полипептидов и их производных для получения других полипептидов, вариантов и производных, специфических к AF-20; они касаются также непрерывных линий клеток гибридомы, способных выделять такие гуманизированные и химерные антитела, фармацевтических и диагностических композиций, содержащих такие гуманизированные или химерные антитела или фрагменты или их производные, и методов их использования для лечения или диагностики рака.

Результатом описанных здесь различных осуществлений является создание химерных и гуманизированных антител на основе крысиного AF-20 антитела, которые способны связываться с AF-20. Неожиданно оказалось, что химерное антитело, chNYR-1002, и гуманизированное антитело, huNYR-1002, способны связываться с AF-20 антигеном.

В одном из осуществлении этого изобретения описывается химерное производное AF-20 антитела, chNYR-1002, в котором крысиные переменные области NYR-1002, V_H и V_K, соответственно были присоединены с постоянными областями, IgG1 или K, человека. Другие осуществления включают другие химерные производные NYR-1002, имеющие различные человеческие постоянные области, например, постоянные области IgG2 или λ, которые используются для присоединения к крысиным переменным областям NYR-1002, V_H и V_K.

Другое осуществление описывает гуманизированное производное, chNYR-1002, химерного антитела, huNYR-1002, в котором были идентифицированы потенциальные эпитопы человеческих Т-клеток (в аминокислотных последовательностях V_H и V_K областей chNYR-1002), и аминокислотные последовательности предполагаемых эпитопов Т-клеток были модифицированы, чтобы элиминировать один или более эпитопов Т-клеток, идентифицированных для элиминирования или уменьшения иммуногенности антитела. Осуществления также охватывают другие гуманизированные производные NYR-1002, в которых различные человеческие постоянные области, например постоянные области IgG2 или λ , используются для присоединения с гуманизированными переменными областями NYR-1002, V_H и V_K , которые содержатся в huNYR-1002.

Следующее осуществление описывает последовательности аминокислот и соответствующих нуклеиновых кислот CDRs, идентифицированных в V_H и V_K областях NYR-1002: CDR 1 (SEQ ID No. 44), CDR 2 (SEQ ID No. 45) и CDR 3 (SEQ ID No. 46), легкой цепи и CDR 1 (SEQ ID No. 47), CDR 2 (SEQ ID No. 48), и CDR 3 (SEQ ID No. 49), тяжелой цепи. Однако аминокислотные последовательности этих CDRs могут быть модифицированы. Аминокислотная последовательность каждого CDR, путем замен, вставок и/или делеций аминокислот предпочтительно может быть изменена до 10%, более предпочтительно до 20%, более предпочтительно до 30% и наиболее предпочтительно до 40%, при условии, что полученные при этом гуманизированные антитела, включающие аминокислотные последовательности, сохраняют их связывающую специфику относительно целевого объекта. Поэтому каждый CDR может включать одну, две или более замены аминокислоты, вставки и/или делеции. Предпочтительно, аминокислотная последовательность каждого CDR существенно гомологична аминокислотной последовательности специфического CDR, описанного в данном изобретении. Специалисты оценят, что внесение в список специфической аминокислотной последовательности в действительности означает внесение в этот список всех таких модификаций, последовательности которых существенно сохраняют активность и полезность.

Описанные здесь полинуклеотидные и полипептидные последовательности применяются для получения других гуманизированных антител, например, путем замещения CDR-областей переменных регионов человеческого антитела. Эти последовательности используются также для генерирования других гуманизированных переменных областей, например, путем замещения CDR-областей переменных регионов человеческого антитела, где наблюдается существенная гомология между человеческими переменными областями и крысиными переменными областями NYR-1002. Эти последовательности также применяются для создания полипептидов, способных связывать AF-20 антиген. Описанные здесь полинуклеотидные и полипептидные последовательности применяются также для идентификации значительно гомологичных CDRs человеческих или гуманизированных антител, например таких антител, которые содержатся в библиотеке или банке. Эти осуществления далее охватывают гуманизированные антитела и фрагменты антитела, в которых один или более CDRs в гуманизированном антителе заменены CDR(s), описанными здесь. Осуществления также охватывают биспецифические антитела, фрагменты антитела и полипептиды, содержащие один или более CDRs этого изобретения.

Описанные здесь осуществления включают далее варианты и эквиваленты, которые являются существенно соответственными гуманизированным антителам, фрагментам антитела, полипептидам, переменным областям и описанным здесь CDRs. Они могут содержать, например, консервативные замещающие мутации (т.е., замена одной или более аминокислот подобными аминокислотами). Например, консервативная замена означает замену одной аминокислоты другой, в пределах того же самого общего класса, напр., одна кислая аминокислота заменяется другой кислой аминокислотой, одна основная аминокислота заменяется другой основной аминокислотой или одна нейтральная аминокислота заменяется другой нейтральной аминокислотой. Значение консервативной замены аминокислоты хорошо известно в технике молекулярной биологии.

Фраза «существенно гомологичный» используется здесь в отношении подобия зависимой аминокислотной последовательности (олигопептид, полипептид, или белок) и базовой эталонной аминокислотной последовательности. Эта фраза обычно определяется, как по крайней мере приблизительно 75%-ное «соответствие», т.е., состояние идентичных аминокислотных остатков, расположенных параллельно между зависимой и базовой последовательностями, когда эти последовательности «выровнены», (т.е., когда минимальное число «нулей» оснований вставлено в зависимую и/или базовую последовательность, чтобы соответственно максимизировать число оснований существующих между последовательностями). «Нулевые» основания не являются частью зависимой и базовой последовательностей; кроме того, минимальное число «нулевых» оснований, вставленных в зависимую последовательность, может отличаться от минимального числа «нулевых» оснований, вставленных в базовую последовательность. В этом определении базовая последовательность считается «связанной» с зависимой последовательностью, где обе аминокислотные последовательности составляют белки или части белков, которые являются AF-20 антителами, фрагментами антитела или полипептидами со способностью связываться с AF-20. Каждый из белков, включающих AF-20 антитела, фрагменты антитела или полипептиды, независимо могут быть антителами, фрагментами антитела, полипептидами или би- или полифункциональными белками, напр., типа слившихся белков, би- и мультиспецифических антител, однокитевых антител или их мультимеров и т.п.

Дальнейший аспект этого изобретения рассматривает аминокислотные последовательности и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот гуманизированных V_H и V_L областей huNYR-1002. Эти последовательности используются для генерирования других гуманизированных антител, например для замены соответствующих переменных областей человеческого антитела. Эти последовательности используются также для идентификации значительно гомологичных переменных областей человеческих или гуманизированных антител, типа таких антител, которые содержатся в библиотеке или банке. Эти последовательности применяются также для создания фрагментов антител и полипептидов, способных связываться с AF-20 антигеном. Осуществления далее охватывают гуманизированные антитела и фрагменты антитела, в которых одна или более первоначальных переменных областей в гуманизированном антителе заменены описанной здесь переменной областью (областями). Эти осуществления также охватывают биспецифические антитела, фрагменты антитела и полипептиды, содержащие одну или более гуманизированных переменных областей, описанных здесь.

Осуществления данного изобретения охватывают также использование описанных здесь гуманизированных антител, фрагментов антитела, CDRs и гуманизированных переменных областей, в молекулярных технологиях развития, типа технологий визуализации фага и технологии визуализации поверхности бактериальных и дрожжевых клеток. Технологию визуализации фага (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990)) можно использовать для получения новых человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из генов переменных областей или генов, кодирующих гуманизированные антитела или фрагменты антитела. Согласно этой технике, гены переменной области антитела клонированы в каркасе гена главного или малого белка оболочки нитеобразного бактериофага, типа M13 или fd и действуют как функциональные фрагменты антитела на поверхности частицы фага. Поскольку нитеобразная частица содержит одноклеточную копию ДНК генома фага, то выборы, основанные на функциональных свойствах антитела также кончаются выбором гена, кодирующего антитело с указанными функциональными свойствами. Таким образом, фаг подражает некоторым из свойств В-клетки.

Визуализация фага может быть выполнена в различных форматах, с которыми можно ознакомиться, например, в обзоре: Johnson et al., Current Opinion in Structural Biology, 3: 564 (1993). Переменные сегменты гена могут использоваться для визуализации фага. Clackson et al., (Nature 352: 624 (1991)) изолировали разнообразное множество антиоксалононовых антител, от маленькой случайной комбинаторной библиотеки генов переменных областей, полученных из селезенок иммунизированных мышей. В естественном иммунном ответе гены антитела накапливают высокий процент мутации (соматическая гипермутация). Некоторые из введенных замен обуславливают более высокую аффинность, и В клетки, проявляющие высокоаффинный поверхностный иммуноглобулин, предпочтительно реплицируются и дифференцируются в течение последующей антигенной стимуляции. Этот естественный процесс можно копировать, используя методы, которые вводят маленькие случайные мутации в генах антитела. Этим методом могут быть улучшены аффинность, специфичность, иммуногенность или другие характеристики гуманизированных антител и могут быть выявлены новые гуманизированные антитела, фрагменты антитела и полипептиды, способные связываться с AF-20 антигеном.

Другое осуществление данного изобретения охватывает химерные и гуманизированные антитела и фрагменты антитела, полученные из других нечеловеческих моноклональных антител, которые связываются с AF-20. Выращивание моноклональных антител из желательного антигена известно в молекулярной биологии. United States Patent № 5703213 описывает один из методов генерирования крысиных моноклональных антител AF-20 антигеном, путем иммунизации мышей клетками FOCUS HCC. Этот метод применим для генерации других AF-20 антител мышей и других нечеловеческих животных-хозяев.

Другие методы производства нечеловеческих антител известны в технике и могут быть применены для иммунизации AF-20 антигена, непосредственно или в изолированном виде, клетками FOCUS HCC. Моноклональные антитела могут быть получены методом гибридомы, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), или методами рекомбинантной ДНК (US. Pat. № 4816567). В методе гибридомы, мышь или другое соответствующее животное-хозяин, типа хомяка или обезьяны-макаки, иммунизируют путем многократной подкожной (sc) или внутрибрюшинной (ip) инъекции антигена и адъюванта, типа монофосфорильного липида А (MPL)/дикрономиколата трегалозы (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc, Hamilton, Mont.), в множественных регионах. Две недели спустя животных стимулируют, 7-14 дней спустя у животных отбирают кровь и анализируют сыворотку на антититр антигена. Животных стимулируют до плато титра. Сыворотки собирают и выделяют из них многоклоновые антитела в соответствии с обычными процедурами очистки иммуноглобулина, как например, типа хроматографии белка на колонке А-сефарозы, хроматографии на колонке гидроксилапатита, гель-фильтрации, диализа, или антиген-аффинной хроматографии.

Метод, описанный выше, используется для выявления лимфоцитов, производящих или способных к созданию антител, которые специфично связываются с иммунизирующим агентом. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. В таком случае, лимфоциты могут быть слиты с клетками миеломы, используя подходящий агент для слияния, типа полиэтиленгликоля, для формирования клетки гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Моноклональные антитела: принципы и практика), стр. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Приготовленные таким образом клетки гибридомы могут быть отобраны и выращены в подходящей среде для культивирования, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, ингибирующих рост или выживание не слитых родительских клеток миеломы. Например, если родительские клетки миеломы испытывают недостаток в ферменте - гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазе (HGPRT или HPRT), то среда культивирования для гибридомы обычно будет включать гипоксантин, аминокпертин, и тимидин (среда HAT), т.е. вещества, которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительными клетками миеломы являются те, которые осуществляют процесс эффективного слияния и производство высокого уровня антитела на стабильном носителе, производящими антитело отобранными клетками, которые чувствительны к среде, например, к среде типа HAT. Среди них предпочтительными линиями клеток являются крысиные линии миеломы типа полученных из MOP-21 и M.C.-11 опухолей мыши, доступных от Salk Institute Cell Distribution Center (Центра Распределения Клеток Института Солка), San Diego, Calif. USA, и из SP-2 или X63-Ag8-653 клеток, доступных от ATCC. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы человека и мыши также были предложены для производства человеческих моноклональных антител (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Моноклональные методы производства антитела и их применения), стр. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Среда для культивирования, в которой растут клетки гибридомы, может быть использована для производства моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно, специфика связывания моноклональных антител, произведенных клетками гибридомы, определяется иммунным осаждением или анализом на связывание *in vitro*, типа радиоиммунологической пробы (RIA) или метода обнаружения специфических антител с помощью иммобилизованного на антигене фермента (ELISA). Например, сродство к связыванию моноклонального антитела может быть определена анализом Скэтчарда (Scatchard) по Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980). Один из таких методов определения связывающей специфики AF-20 антигена описан в US Patent № 5703213.

Рассмотренные в данном изобретении антитела также могут быть описаны или определены по их способности связываться с AF-20 полипептидом. Предпочтительные величины сродства к связыванию включают те, при которых константа диссоциации или K_d меньше чем 1 мкмоль, более предпочтительно, меньше чем приблизительно 100 наномоль и наиболее предпочтительно, меньше чем приблизительно 1 наномоль.

После того как идентифицированы клетки гибридомы, производящие антитела желательной специфичности, аффинности и/или активности, осуществляют субклонирование клонов, ограничивая процедуры разбавления и применяя стандартные методы выращивания (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Моноклональные Антитела: Принципы и Практика), стр. 59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие для этой цели среды для культивирования включают, например, среды D-МЕМ или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo*, как асцитные опухоли в животном.

Моноклональные антитела, выделенные субклонами, могут быть соответственно отделены от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки, в соответствии с обычными процедурами очистки иммуноглобулина типа, например, хроматографии белка на колонке А-сефарозы, хроматографии на колонке гидроксилатапта, гель-электрофореза, диализа или аффинной хроматографии.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко изолирована и секвенирована с использованием обычных процедур (напр., используя олигонуклеотидные зонды, которые способны специфически связывать гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Клетки гибридомы служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые, после этого, трансфектируются в клетки хозяина, типа клеток *E. coli*, клеток COS обезьяноподобных, клеток яичника китайского хомяка (CHO) или клеток миеломы, которые иначе не производят белок иммуноглобулина, для осуществления синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках хозяина. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 (1992). Существуют также и другие методы получения нечеловеческих моноклональных антител, способных связываться с AF-20 антигеном.

Полученные таким образом моноклональные антитела и ДНК, кодирующая такие антитела, после этого могут быть использованы для получения химерных антител, гуманизированных антител и фрагментов антител в соответствии с методами, описанными в данном изобретении или другими методами, известными специалистам.

Предпочтительный метод состоит в том, чтобы сделать нечеловеческое антитело неиммуногенным или менее иммуногенным для человека, путем определения по крайней мере части аминокислотной последовательности антитела (предпочтительно, части нечеловеческого происхождения, типа V_H и V_L области нечеловеческого антитела), путем определения одного или более потенциальных эпитопов для человеческих Т-клеток и путем модифицирования аминокислотной последовательности, для элиминирования по крайней мере одного из предполагаемых эпитопов Т-клеток, таким образом устраняя или уменьшая иммуногенность белка или его части, когда они подвергаются воздействию иммунной системы че-

ловека. По этим методам может быть получен набор измененных антител. После этого полученные модифицированные антитела могут быть подвергнуты скринингу на уровне экспрессии иммуногенности, аффинности и специфичности связывать AF-20 антиген, и на основе полученных данных осуществлён выбор наилучшего кандидата (кандидатов).

Специалистам хорошо известны другие методы получения химерных антител и гуманизированных антител из нечеловеческих антител или уменьшения иммуногенности нечеловеческих антител. Эти методы, без ограничения, включают:

создание химерных антител путем присоединения переменных областей тяжелых и легких цепей нечеловеческого антитела с постоянными областями человеческого антитела, как описано у Cabilly, et al., United States Patent № 4816567; Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne, G.L. et al., Nature 312: 643-646 (1984); Neuberger, M.S. et al., Nature 314: 268-270 (1985);

создание гуманизированных антител замещением нечеловеческих областей (CDRs) или последовательностей CDR, определяющих комплементарность, соответствующими областями человеческого антитела, как описано у Winter, United States Patent № 5225539 и Jones, P.T. et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann, L. et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven, M. et al., Science 239: 1534-1536 (1988). Это может привести также к замене некоторых FR остатков в человеческом антителе остатками аналогичных участков нечеловеческого антитела, чтобы сохранить связывающий антиген, как описано, например, у Queen, et al., United States Patent №№ 5530101, 5585089, 5693762, 6180370; Carter, et al., United States Patent №№ 6054297, 6407213 и 6639055, Adair, United States Patent № 6632927 и Winter, United States Patent № 6548640;

создание гуманизированных антител отборным замещением остатков в переменных областях нечеловеческого антитела, как описано, например, у Pedersen, et al., United States Patent № 5639641, Studnicka, et al., United States Patent №№ 5766886 и 5821123, и Carr et al., United States Patent Application № 10/300215;

соединение антитела или фрагмента антитела с автоантигенными последовательностями, что делает нечеловеческое антитело или фрагмент антитела менее иммуногенным, как описано у Jordan, et al., United States Patent № 6652863.

Как описано выше, ДНК, кодирующая моноклональное антитело или фрагмент-интерес антитела, может быть изолирована от ее гибридомы или исходного клона визуализации фага, а затем, манипулируя, можно создать гуманизированные, и/или аффинно-зрелые конструктивные элементы. Кроме того, можно использовать известные методы, чтобы ввести остаток аминокислоты или остатки аминокислот в любое желательное местоположение полипептидной цепи фрагмента антитела, напр., остаток цистеина, помещенный в стержневую область тяжелой цепи, таким образом создается сайт для специфического присоединения молекул(ы) полимера. В одном осуществлении нативный остаток цистеина в легкой или в тяжелой цепи фрагмента антитела, который обычно формирует дисульфидный мост, связывающий легкие и тяжелые цепи, заменяют другой аминокислотой, типа серина, чтобы остаток-партнёр цистеина в противоположной цепи сохранял свободную сульфгидрильную группу для специфического присоединения молекулы полимера.

Для конструирования желательного антитела, или клона, кодирующего фрагмент антитела, клон может использоваться для рекомбинантного получения антитела или фрагмента антитела, путем применения методов, известных специалистам. Наконец, антитело или продукт фрагмента антитела могут быть снова выделены из клеточной культуры хозяина и очищены, применяя методы, известные специалистам или описанные здесь. В случае осуществлений, использующих фрагмент антитела, проектируемый без остатка цистеина, как описано выше, предпочтительные рекомбинантные системы получения включают бактериальную экспрессию и процедуры выделения продукта, известные специалистам или описанные здесь. Если получают антитело полной длины, желательный фрагмент антитела может быть получен отсюда, подвергая интактное антитело ферментативному гидролизу согласно методам, известным в технике.

Описанные здесь химерные и гуманизированные антитела, фрагменты и полипептиды могут быть получены согласно известным методам. Один детальный метод получения сформулирован в примерах. Предполагается, что рядовой специалист способен заменить описанные ниже методы обычными известными методами ради достижения тех же самых или подобных результатов. Гуманизированные антитела, описанные в этих осуществлениях, могут быть получены согласно следующему процессу:

(а) конструированный обычными методами вектор экспрессии содержит (1) оперон с (2) последовательностью ДНК, кодирующей тяжелую цепь антитела, в котором CDRs и другие минимальные части переменной области каркасного региона, которые необходимы для сохранения способности специфического связывания антитела, получены из нечеловеческого антитела, и (3) полученные из человеческого антитела остальные части цепи антитела, которые производят вектор, описанный в данном изобретении;

(b) конструированный обычными методами вектор экспрессии содержит оперон с последовательностью ДНК, кодирующую комплементарную легкую цепь антитела, в котором CDRs и другие минимальные части переменной области каркасного региона, которые необходимы для сохранения способности специфического связывания донорного антитела, получены из нечеловеческого антитела, и остальные

части цепи антитела, полученные из человеческого антитела, которые производят вектор, описанный в данном изобретении;

(с) трансфектируют векторы экспрессии в клетку хозяина обычными методами, чтобы осуществить трансфекцию клетки хозяина, используемой в данном изобретении; и

(d) культивируют трансфектированную клетку хозяина обычными методами, чтобы получить измененное антитело, описанное в данном изобретении.

Клетку хозяина можно совместно трансфектировать с двумя векторами данного изобретения, с первым вектором, содержащим оперон, кодирующий полипептид легкой цепи, и со вторым вектором, содержащим оперон, кодирующий полипептид тяжелой цепи. Эти два вектора содержат различные выбираемые маркеры, но кроме антитела, кодирующего последовательности тяжелой и легкой цепи, они предпочтительно идентичны, чтобы по желанию добиться одинаковой экспрессии тяжелых и легких полипептидных цепей. Альтернативно можно использовать отдельный вектор, который включает последовательности, кодирующие легкие и тяжелые полипептидные цепи. Последовательности кодирования для легких и тяжелых цепей могут включить кДНК, геномную ДНК или обеих.

Клетка хозяина, используемая для экспрессии измененного антитела данного изобретения, может быть бактериальной клеткой типа *Escherichia coli*, или эукариотической клеткой. В особенно предпочтительных осуществлениях этого изобретения, может использоваться клетка млекопитающего, которая точно определена для этой цели, типа клетки миеломы или клетки яичника китайского хомяка (СНО).

Общие методы для конструирования векторов данного изобретения, методы трансфекции, которые необходимы для получения клетки хозяина, используемой в данном изобретении, а также методы культур, которые необходимы для получения антитела, описанного в данном изобретении с помощью указанных клеток хозяина, все являются известными методами. Приведенные ниже примеры описывают один такой метод. Хотя, линия клеток, используемая для получения гуманизированного антитела предпочтительно относится к линии клеток млекопитающего, может альтернативно также использоваться любая другая подходящая линия клеток, типа бактериальной линии клеток или линии клеток дрожжей. В частности можно использовать *E. coli*-производные бактериальные штаммы.

Гуманизированные антитела, полученные согласно осуществлениям данного изобретения, могут быть очищены согласно стандартным процедурам молекулярной биологии, включая фильтрацию с поперечным потоком, осаждение сульфатом аммония, аффинную колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п.

Понятно, что гуманизированные антитела, полученные согласно этим осуществлениям, функционируют идентичным или существенно аналогичным образом, что и подобные негуманизированные варианты тех же самых антител. Однако по сравнению с негуманизированными вариантами тех же самых антител, гуманизированные антитела успешнее используются для человека. Гуманизированные антитела, описанные в данных осуществлениях, могут использоваться для проектирования и синтеза пептидных или непептидных соединений (миметиков), которые, подобно антителу, применяются для той же самой терапии (Saragobi et al., *Science* 253: 792-795 (1991)). Содержание данной ссылки включено сюда полностью.

Осуществления этого изобретения также охватывают фрагменты гуманизированных антител, способных к связыванию с AF-20 антигеном. По сравнению с интактными антителами, фрагменты антител могут обеспечить существенные преимущества, особенно следует отметить тот факт, что рекомбинантные фрагменты антитела могут быть созданы в системах экспрессии бактериальной клетки. Системы экспрессии бактериальной клетки обеспечивают несколько преимуществ перед системами экспрессии клеток млекопитающих, включая уменьшенную продолжительность и уменьшенные затраты для научных исследований и этапов производства продукта.

Фрагменты антитела могут быть произведены любым известным или описанным здесь методом. Вообще, фрагмент антитела получают из родительского интактного антитела. Желательные фрагменты антитела могут быть получены из очищенных препаратов антитела обычными ферментативными методами, напр., фрагменты F(ab')₂ получают расщеплением пепсином интактного антитела, а фрагменты Fab получают путем кратковременного гидролиза интактного антитела папаином.

Некоторые осуществления включают также использование биспецифических и гетероконъюгатных фрагментов антитела, специфических, по крайней мере, для двух различных антигенов. Биспецифические и гетероконъюгатные антитела могут быть получены аналогичным образом, как и антитела полной длины или фрагменты антител (напр., фрагменты F(ab')₂ биспецифического антитела). Обсуждается возможность использования в данном изобретении также фрагментов антител, имеющих больше чем две валентности (напр., трехвалентные или более мновалентные фрагменты антитела). Биспецифические антитела, гетероконъюгированные антитела и мновалентные антитела могут быть получены методами, известными специалистам, или описанными здесь.

Осуществления данного изобретения включают также терапевтические составы, содержащие гуманизированные антитела, фрагменты антитела и полипептиды, описанные здесь. Например, описанные здесь гуманизированные антитела, фрагменты антитела и полипептиды могут быть конъюгированы с компонентом эффектора, имеющего терапевтическую активность и селективно использованы для целе-

вых клеток, которые осуществляют экспрессию AF-20 антигена. Такие конъюгаты могут быть использованы для интернализации AF-20 антител при их связывании с AF-20 антигеном. Известно много таких компонентов эффекторов, которые включают цитотоксические агенты, модификаторы иммунологических ответных реакций, олигонуклеотиды, гены, вирусные векторы содержащие терапевтические гены, липосомы содержащие гены или цитостатические агенты, пролекарства или ферменты.

Специалистам известно много цитотоксических агентов. Они включают химиотерапевтические агенты типа карбоплатина, цисплатина, паклитаксела, гемцитабина, калихаемицина, доксорубина, 5-фторурацила, митомицина C, актиномицина D, циклофосфида, винкристина и блеомицина. Токсические ферменты растений и бактерий типа рицина, токсина дифтерии и токсина *Pseudomonas* могут быть конъюгированы с гуманизированными антителами, фрагментами антитела и полипептидами этого изобретения, чтобы изготовить реагенты для специфического уничтожения определенных клеток (Youle, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4539 (1980); Krolick, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5419 (1980)). Другие цитотоксические агенты включают цитотоксические рибонуклеазы, как описано у Goldenberg в патенте США № 6653104.

Осуществления данного изобретения касаются также радиоиммуноконъюгатов, где радионуклид, который испускает альфа или бета-частицы, стабильно соединен с антителом, фрагментом антитела или полипептидом, с использованием или без использования образующего комплекс агента. Такие радионуклиды включают агенты, испускающие бета-частицы, типа Фосфора-32 (32P), Скандия-47 (47Sc), Меди-67 (67Cu), Галлия-67 (67Ga), Иттрия-88 (88Y), Иттрия-90 (90Y), Иода-125 (125I), Иода-131 (131I), Самария-153 (153Sm), Лютеция-177 (177Lu), Рения-186 (186Re) или Рения-188 (188Re), и испускающие альфа-частицы, типа Астатина-211 (211At), Свинца-212 (212Pb), Висмута-212 (212Bi), Висмута-213 (213Bi) или Актиния-225 (225Ac).

Особенно предпочтительное осуществление включает конъюгацию пептидов NTP или их производных с гуманизированными антителами, и эти продукты подробно рассмотрены в указанных осуществлениях.

Терапевтические композиции могут использоваться, чтобы ввести модификаторы иммунологических ответных реакций в клетки опухоли, которые выражают AF-20 антиген, и таким образом, непосредственно или косвенно отмечают клетки опухоли, предназначенные для разрушения иммунной системой пациента. Терапевтические композиции также могут использоваться, чтобы ввести последовательности гена в клетки опухоли, которые выражают AF-20 антиген, тем самым создавая возможность экспрессии гена в клетках опухоли. Ген может быть заменен геном, или к нему можно добавить гены, которые вредны или безразличны для клетки опухоли, таким образом вызывая смерть клетки через апоптоз или другие механизмы, ингибируя или предотвращая пролиферацию или миграцию опухолевой клетки, отмечая клетки опухоли предназначенные для разрушения иммунной системой пациента, или осуществляя подобные или другие терапевтические эффекты. Для генома опухолевой клетки ген может быть экзогенным. Такой ген может выразить цитотоксический белок или фермент, способный расщеплять пролекарство на цитотоксические компоненты. Такие последовательности гена можно поставить целевой клетке (клеткам) посредством системы поставки гена, типа вирусных векторов или липосом, конъюгированных с терапевтическими композициями этого изобретения.

Точно так же терапевтические композиции могут использоваться, чтобы ввести олигонуклеотиды в клетки опухоли, которые выражают AF 20 антиген. Такие олигонуклеотиды могут включить антисмысловые олигонуклеотиды, которые ингибируют функционирование целевых мРНК в клетке опухоли; краткосрочно вмешивающиеся рибонуклеиновые кислоты (siRNAs), ингибирующие экспрессию белков в клетках опухоли, которая необходима для жизнеспособности, пролиферации, или миграции; рибозимы; агенты, увеличивающие восприимчивость клеток опухоли к другим видам противоопухолевого лечения; и олигонуклеотиды формирующие тройную спираль.

Осуществления этого изобретения рассматривают также фармацевтические композиции, содержащие различные терапевтические составы, типа двух или более различных конъюгатов антител, каждый с различным антителом или с различным компонентом эффектора. Компонент эффектора может включить гены или другие олигонуклеотиды, которые, при введении в клетку опухоли, в результате интернализации терапевтического антитела, обеспечивает благоприятный терапевтический ответ типа стимулирования клеточного апоптоза; замены дисфункционального гена; экспрессии терапевтически благоприятного белка; и т.п. Ген может быть помещен в липосому или присоединен к соответствующему вектору типа вируса.

В другом осуществлении данного изобретения, специфичность к AF-20 и уменьшенная иммуногенность делают описанные здесь химерные и гуманизированные антитела, пригодными для использования в качестве диагностических агентов, когда они конъюгированы с обнаружимой меткой, для обнаружения различных типов рака, типа гепатоцеллюлярных карцином, аденокарцином легкого и колоректальных карцином. Такие композиции могут быть полезны для диагноза, выбора соответствующего режима лечения и оценки прогноза раковых образований, характеризующихся экспрессией AF 20 (основанной на уровнях экспрессии AF 20); они могут быть полезны в качестве агентов для визуализации опухоли или в качестве радиоактивно меченных антител в хирургии с радиоиммунологическим наведением. RTM. Сис-

тема (RIGS. RTM.). См. Hinkle et al., *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 4 (3): 339-358 (1991).

В технике известно много обнаружимых меток, которые могут быть конъюгированы с антителом или полипептидом. Обнаружимые метки включают радионуклиды типа ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{86}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , или ^{177}Lu . Методы обнаружения таких меток включают сканирование ПЕТ и иммунную сцинтиграфию. Обнаружимые метки для анализов *in vitro* включают ферменты типа пероксидазы хрена; флюорофоры; хромофоры; хемилюминесцентные агенты; радионуклиды; хелатные комплексы; красители; коллоидное золото или частицы латекса.

Диагностические композиции этого осуществления могут использоваться также в анализах *in vitro*, для определения наличия у человека или животных ракового заболевания, выражающего AF-20 антиген. Такой анализ можно использовать для диагностики рака, определения фазы заболевания и разработки режима лечения. Предпочтительно, такой анализ следует использовать для определения наличия у человека или животных рака, который является восприимчивым к лечению терапевтической композицией, способной к связыванию с клетками опухоли, выражающими AF-20 антиген. Наиболее предпочтительно такой анализ можно использовать, чтобы определить, следует ли лечить и как лечить пациента или животное терапевтической композицией этого изобретения.

Методы улучшения и развития таких анализов известны в технике. Типы анализов без ограничений включают иммунопатологический анализ биопсийной ткани диагностической композицией этого изобретения и иммунологические обследования, где образец ткани или физическую жидкость обрабатывают диагностической композицией этого изобретения.

Специалистам известно много методов конъюгации с компонентами эффекторов или с обнаружимыми метками. Известно связывание антител с желательными эффекторами. См. напр., US Pat. № 5435990, выданный Cheng et al., раскрытие которого полностью включено здесь в виде ссылки. Кроме того, хорошо известны и широко доступны бифункциональные линкеры для облегчения такого присоединения. Также известны и доступны хелатообразователи (хелаторы и хелатные соединения), обеспечивающие присоединение радионуклидов.

Терапевтические и диагностические композиции могут быть использованы в диагнозе и лечении раковых образований. Предпочтительно, такие раковые образования - аденокарциномы, и наиболее предпочтительно, такие раковые образования - гепатоцеллюлярные карциномы, аденокарциномы легкого и колоректальные карциномы.

Терапевтические композиции применяются также для лечения раковых образований и других опухолей, которые выражают AF-20 антиген. Они могут использоваться отдельно или в комбинации с другим видом противораковой или противоопухолевой терапии, типа химиотерапии, иммунотерапии, лучевой терапии, хирургического вмешательства или абляционной терапий.

Специалист сможет (путем обычного экспериментирования) определить количество антитела, фрагмента антитела или полипептида, которые эффективны и не токсичны при лечении конкретного вида рака. Однако обычно эффективные дозы составляют диапазон приблизительно 0,05-100 мг/кг веса тела в день и предпочтительно от приблизительно 0,5-25 мг/кг веса тела в день.

Описанные здесь химические или гуманизированные антитела, фрагменты антитела или полипептиды, в соответствии с вышеупомянутыми методами лечения, можно вводить человеку или другому животному в количестве, достаточном, чтобы произвести терапевтический или профилактический эффект. Антитела могут вводиться такому человеку или другому животному в обычной форме дозировки, приготовленной путем комбинирования антитела с обычным, лечебно-приемлемым носителем, разбавителем и/или наполнителем, согласно известным методам. Специалист легко заметит, что форма и характер лечебно-приемлемого носителя, разбавителя и/или наполнителя определяется количеством входящего в композицию активного компонента, маршрутом введения препарата и другими известными переменными.

Лечебно приемлемые композиции могут включать, напр., подходящий растворитель, в случае необходимости, консерванты типа бензилового спирта и буфер. Соответствующий растворитель может включать, напр., воду, водные спирты, гликоли, фосфонатные и карбонатные сложные эфиры. Такие водные растворы содержат не больше, чем 50% (по объему) органического растворителя. Композиции типа суспензии могут включить жидкую среду для образования суспензии, типа носителя, напр., водный поливинилпирролидон, инертные масла, типа растительных масел или высоко очищенных минеральных масел или водные эфиры целлюлозы, типа водной карбоксиметилцеллюлозы. В композиции может присутствовать также загуститель, типа желатина или альгината, одно или более естественных или синтетических поверхностно-активных веществ, пеногасители и один или более суспендирующих агентов, типа сорбита или другого сахара. Такие композиции могут содержать один или более адъювантов.

Путь введения антител, фрагментов или полипептидов данного изобретения может быть оральным, парентеральным, ингаляционным или локальным. Используемый здесь термин «парентеральный» включает внутритромбозное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, влагалищное или внутривибрюшинное введение. Внутритромбозные, внутривенные и внутримышечные формы парентерального введения являются предпочтительными путями введения.

Ежедневные парентеральные и оральные режимы дозировки для профилактического или терапевтического использования гуманизированных антител данного изобретения вообще охватывают диапазон приблизительно 0,005-100, но предпочтительно приблизительно 0,5 к 10 мг/кг веса тела в день.

Антитела могут быть также введены путем ингаляции. «Ингаляция» обозначает интраназальное и оральное введение путем ингаляции. Соответствующие формы дозировки для такого введения включают аэрозольную композицию или измеренную ингаляционную дозу, которые могут быть приготовлены обычными методами. Используемое предпочтительное дозированное количество соединения данного изобретения находится в диапазоне приблизительно 0,1-100, более предпочтительно приблизительно 10-100 мг/кг веса тела.

Антитело может быть введено также и локально. Локальное введение обозначает несистемное введение. Оно включает введение композиции гуманизированного антитела (или гуманизированного фрагмента антитела) внешне, через эпидермис или полость рта, и инсталляцию такого антитела в ухо, глаз или нос, и всюду, где оно интенсивно не включается в кровоток. Системное введение обозначает оральное, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное и внутримышечное введение. Разумеется, количество антитела, требуемого для терапевтического, профилактического или диагностического эффекта, изменяется с выбранным антителом, характером и серьезностью заболевания, против которого осуществляется лечение животного, и, в конечном счете, определяется врачом. Подходящая локальная доза антитела данного изобретения вообще находится в пределах диапазона ежедневно приблизительно 1-100 мг/кг веса тела.

Введение описанного здесь антитела, фрагмента или полипептида возможно как отдельно, так и предпочтительно - в виде фармацевтической композиции. Такая композиция для локального введения может включать активный ингредиент от 0,001 до 10 вес./вес.%, напр., от 1 до 2% от веса композиции, и хотя она может включать и целых 10 вес./вес.%, но предпочтительно не более 5 вес./вес.%, и более предпочтительно от 0,1 до 1 вес./вес.% композиции.

Локальные композиции могут включать активный ингредиент вместе с одним или более приемлемым для этого носителем (носителями), и по необходимости, любой другой терапевтический ингредиент (ингредиенты). Носитель (носители) обычно «приемлем» в смысле того, что совместим с другими ингредиентами композиции и безвреден для пациента. Композиции, пригодные для локального введения, включают жидкие или полужидкие препараты типа жидких мазей, лосьонов, кремов, мазей или паст и капель, подходящих для закапывания в глаз, ухо или нос, предназначенные для проникновения через кожу к участку, требующему лечения.

Капли могут включать стерильные водные или масляные растворы или суспензии и могут быть приготовлены путем растворения активного ингредиента в подходящем водном растворе бактерицидного, и/или фунгицидного агента, и/или любого подходящего консерванта, и предпочтительно включают поверхностно активный агент. После этого полученный раствор можно осветлить и стерилизовать путем фильтрации и с помощью стерильной техники поместить в контейнер. Примерами бактерицидных и фунгицидных агентов, подходящих для включения в эти капли, могут служить нитрат или ацетат фенол-ртути (0,002%), хлорид бензалкония (0,01%) и ацетат хлоргексидина (0,01%). Подходящие растворители для подготовки масляного раствора включают глицерин, разбавленный спирт и пропиленгликоль.

Лосьоны включают композиции, подходящие для нанесения на кожу или закапывания в глаз. Лосьон для закапывания в глаз может включать стерильный водный раствор, произвольно содержащий бактерицид и может быть приготовлен методами, подобными тем, которые применяются для приготовления капель. Лосьоны или жидкие мази для нанесения на кожу могут также включать агент для ускорения высыхания и охлаждения кожи, типа спирта или ацетона и/или увлажняющий агент типа глицерина или масла типа касторового или арахисового.

Обычно кремы, мази или пасты - это полутвердые композиции активного ингредиента для внешнего применения. Их можно приготовить, смешивая тонкодисперсный или порошкообразный ингредиент, один или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, при помощи подходящих машин с жирной или нежирной основой. Основа может включать углеводороды типа твердого, мягкого или жидкого парафина, глицерин, воск, металлическое мыло; растительный клей; масло естественного происхождения типа миндального, кукурузного, арахисового, касторового или оливкового масла; шёрстный жир или его производные, или жирную кислоту типа стеариновой или олеиновой кислоты, вместе со спиртом типа пропиленгликоля или макроголи. Композиция может включать любой подходящий поверхностно-активный агент типа анионного, катионного или неионогенного поверхностно-активного агента типа сложных эфиров сорбитана или их полиоксиэтиленовых производных. В композицию могут быть включены также суспендирующие агенты, такие как натуральные смолы, производные целлюлозы или неорганические материалы типа коллоидного кремнезёма и другие компоненты типа ланолина.

Комплекты согласно осуществлению включают замороженные или лиофилизированные химерные или гуманизированные антитела, фрагменты антитела или полипептид, который должен быть воссоздан, соответственно, путем оттаивания (произвольно сопровождаемого дальнейшим растворением) или суспендирования в жидкое (предпочтительно буферизованное) транспортное средство. Комплекты также могут включать буфер и/или раствор наполнителя (в жидкой или замороженной форме), или порошкооб-

разные композиции буфера и/или наполнителя, предназначенные для растворения в воде - для смешивания с гуманизированными антителами или гуманизированными фрагментами антитела, чтобы приготовить композицию, пригодную для введения. Таким образом, комплекты, содержащие химерные или гуманизированные антитела, фрагменты антитела или полипептиды, предпочтительно заморожены, лиофилизированы, предварительно разбавлены или предварительно смешаны при такой концентрации, что в результате их нагревания до определенной температуры и добавления к ним определенного количества воды или раствора образуется композиция достаточной концентрации и pH для эффективного применения *in vivo* или *in vitro* при лечении или диагностике рака.

Предпочтительно такой комплект также будет включать инструкции по воссозданию и использованию химерного или гуманизированного антитела, фрагмента антитела или состава полипептида для лечения и диагностики рака. Комплект также может включать две или более составляющих части для воссозданной активной композиции. Например, вторая составляющая часть - в дополнение к химерным или гуманизированным антителам, фрагментам антитела или полипептидам - может быть бифункциональным хелатообразующим агентом, бифункциональным хелатом или терапевтическим агентом типа радионуклида, который к тому же при смешивании с гуманизированными антителами или гуманизированными фрагментами антитела образует конъюгированную систему. Вышеупомянутые буфера, наполнители и другие составляющие части могут быть проданы отдельно или вместе с комплектом.

Для специалиста понятно, что оптимальные количества и интервалы индивидуальных дозировок химерных или гуманизированных антител, фрагментов антител или полипептидов описанных здесь осуществлений определяются характером и уровнем развития подвергаемого лечению заболевания, формой, маршрутом и местом введения, и конкретного животного, которое подвергается лечению, и система такой оптимизации может быть определена обычными методами. Специалист должен понимать, что оптимальный курс лечения, т.е. количество доз химерных или гуманизированных антител, фрагментов антител или полипептидов данного изобретения, предназначенных для введения за день, в течение определенного числа дней, может быть установлено специалистом путем использования обычных тестов определения режима лечения.

Химерные или гуманизированные антитела, фрагменты антител или полипептиды могут быть также введены в комбинации с другими противоопухолевыми агентами, напр., в комбинации с другими антителами или лекарствами.

Дополнительные осуществления данного изобретения включают рекомбинантную молекулу антитела, имеющую связывающие антиген области из тяжелой или легкой области переменной цепи антитела, которая способна связывать AF-20. Осуществления также включают химерные антитела, включая переменные области, полученные из нечеловеческого антитела, которые связывают AF-20 и человеческие постоянные области. Переменные области химерного антитела предпочтительно получены из крысиного антитела, которое связывает AF-20, и человеческих постоянных областей, и более предпочтительно, из крысиного моноклонального антитела (moAb), произведенного линией клеток гибридомы ATCC обозначенной HB 9686 и человеческих постоянных областей.

Другое осуществление включает химерное антитело, включающее переменную тяжелую последовательность цепи или переменную легкую последовательность цепи, или обеих. Предпочтительно, химерное антитело - chNYR-1002.

Другие осуществления охватывают гуманизированное антитело или гуманизированный фрагмент антитела (обозначенный все вместе как «huAb»), которые связывают AF-20, где гуманизированное антитело или гуманизированный фрагмент антитела получены из нечеловеческого антитела, которое связывает AF-20. Предпочтительно, huAb получен из крысиного моноклонального антитела (moAb), которое связывает AF-20, и более предпочтительно huAb получен из крысиного moAb, произведенного линией клеток гибридомы ATCC обозначенной HB 9686. Особенно предпочтительное гуманизированное антитело - huNYR-1002.

Дополнительное осуществление включает гуманизированное антитело или гуманизированный фрагмент антитела, которые связывают AF-20, включающий регионы определения комплементарности (CDRs) аминокислотных остатков, полученных из нечеловеческого антитела, которое связывает AF-20 и человеческие каркасные области (FRs) аминокислотных остатков. Предпочтительно (CDRs) получены из крысиного moAb, который связывает AF-20 и аминокислотных остатков человеческих каркасных областей (FRs) и более предпочтительно (CDRs) получены из крысиного moAb, произведенного линией клеток гибридомы ATCC, обозначенной HB 9686 и аминокислотных остатков человеческих каркасных областей (FRs).

Особенно предпочтительным является гуманизированное антитело или фрагмент, которые связывают AF-20, где регионы, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) легкой области переменной цепи, и регионы, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) тяжелой области переменной цепи, имеют следующие аминокислотные последовательности:

легкая цепь:CDR1 (SEQ ID NO: **44**) [RASQSIGTS1H];CDR2 (SEQ ID No. **45**) [YASESIS]; иCDR3 (SEQ ID No. **46**) [QQSSSWPFT];тяжелая цепь:CDR1 (SEQ ID NO: **47**) [GYTFAGHYVH];CDR2 (SEQ ID No. **48**) [WIFPGKVNTKYNEKFKG]; иCDR3 (SEQ ID No. **49**) [VGVDYPPYYFDY].

Описанные здесь осуществления включают гуманизированные моноклональные антитела или фрагменты антитела, описанные выше, в которых один или более аминокислотных остатков, в переменных областях или постоянных областях, заменены другими аминокислотными остатками. Предпочтительно один или более аминокислотных остатков в CDRs или FRs заменены другими аминокислотными остатками. Кроме того, осуществления включают одно или более дополнений, замещений или делеций остатков аминокислот, сделанных в человеческих каркасных областях (FRs).

Дальнейшие осуществления, описанные здесь, включают гуманизированные моноклональные антитела или их фрагменты, как описано выше, где потенциальные человеческие эпитопы вспомогательных Т-клеток, идентифицированные в переменных областях, были удалены замещением, дополнением или делецией аминокислотных остатков.

Гуманизированное антитело или гуманизированные фрагменты антитела («hu-mAb»), описанные здесь, предпочтительно имеют связующую AF-20 антиген аффинность, которая составляет по крайней мере 10% аффинности к антителу, из которого hu-mAb был получен. Особенно предпочтительный hu-mAb включает гуманизированную переменную тяжелую последовательность цепи или гуманизированную переменную легкую последовательность цепи, или обеих.

Дополнительное осуществление включает последовательность полипептида, включающую один или более следующих полипептидов:

SEQ ID No. **47** [GYTFAGHYVH];SEQ ID No. **48** [WIFPGKVNTKYNEKFKG];SEQ ID No. **49** [VGVDYPPYYFDY];SEQ ID No. **44** [RASQSIGTS1H];SEQ ID No. **45** [YASESIS]; и/илиSEQ ID No. **46** [QQSSSWPFT].

Описанные здесь осуществления также включают ДНК, кодирующую антитело, полипептид или фрагменты антитела, описанные выше, и любые фрагменты, варианты или их производные. Предпочтительно, молекула ДНК кодирует аминокислотную последовательность гуманизированного антитела или его фрагмента, посредством чего антитело или фрагмент определенно связывает AF-20, где CDRs легкой области переменной цепи и CDRs тяжелой области переменной цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

легкая цепь:CDR1 (SEQ ID NO: **44**) [RASQSIGTS1H];CDR2 (SEQ ID No. **45**) [YASESIS]; иCDR 3 (SEQ ID No. **46**) [QQSSSWPFT];тяжелая цепь:CDR 1 (SEQ ID NO: **47**) [GYTFAGHYVH];CDR2 (SEQ ID No. **48**) [WIFPGKVNTKYNEKFKG]; иCDR3 (SEQ ID No. **49**) [VGVDYPPYYFDY].

Осуществления также включают молекулы ДНК, которые кодируют легкую или тяжелую цепь вышеупомянутых hu-mAb. Предпочтительная молекула ДНК кодирует аминокислотную последовательность гуманизированного антитела или его фрагмента, посредством чего антитело или фрагмент определенно связывает AF-20, где CDRs легкой области переменной цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

CDR1 (SEQ ID No: 44) [RASQSIGTSIH];

CDR2 (SEQ ID No: 45) [YASESIS]; и

CDR3 (SEQ ID No: 46) [QQSSSWPFT].

Другая предпочтительная молекула ДНК кодирует тяжелую цепь антитела или фрагмента, где нуклеотидные последовательности CDRs тяжелых цепей следующие:

CDR1 (SEQ ID No: 47) [GYTFAGHYVH];

CDR2 (SEQ ID No: 48) [WIFPGKVNTKYNEKFKG]; и

CDR3 (SEQ ID No: 49) [VGYDYPYYFDY].

Предпочтительно молекула ДНК находится в форме вектора экспрессии. В этом контексте, осуществления далее включают хозяина, преобразованного с вектором экспрессии. Кроме того, осуществления включают клетку хозяина, включающую рекомбинантную систему экспрессии, кодирующую легкие и тяжелые цепи гуманизированного антитела или гуманизированных фрагментов антитела, описанных выше.

Другие осуществления этого изобретения включают последовательность нуклеиновой кислоты, из которой может быть выражено химерное антитело, описанное здесь. Кроме того, осуществления включают вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты. Предпочтительно вектор является голым сегментом нуклеиновой кислоты, голым сегментом нуклеиновой кислоты связанным с носителем, нуклеопротеином, плазмидой, вирусом, вириоидом, или мобильным генетическим элементом. Другое предпочтительное осуществление включает линию клеток гибридомы, которая производит описанные здесь химерные антитела.

Дополнительные осуществления включают последовательность нуклеиновой кислоты, из которой могут быть выражены гуманизированное антитело, гуманизированный фрагмент антитела или полипептид, описанные выше. В этом контексте осуществления включают далее вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты. Предпочтительно вектор является голым сегментом нуклеиновой кислоты, сегментом нуклеиновой кислоты связанным с носителем, нуклеопротеином, плазмидой, вирусом, вириоидом или мобильным генетическим элементом. Другое предпочтительное осуществление включает линию клеток гибридомы, которая производит гуманизированное антитело, гуманизированный фрагмент антитела или полипептид, описанные здесь.

Некоторые осуществления включают композицию для лечения рака, включающую терапевтически эффективное количество любого из гуманизированных или химерных антител, гуманизированных фрагментов антитела или полипептидов, описанных здесь. Предпочтительно гуманизированное или химерное антитело, гуманизированный фрагмент антитела или полипептид, непосредственно или косвенно, ассоциированы или связаны с компонентом эффектора, обладающим терапевтической активностью. Более предпочтительно, компонентом эффектора является противоопухолевый препарат, химиотерапевтический агент, цитотоксин, радионуклид, терапевтический фермент, пролекарство, цитокин, или антипролиферативный агент. Предпочтительные радионуклиды - ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{125}I , ^{131}I , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{153}Sm , ^{166}Dy , ^{175}Yb , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Os , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , или их смеси или комбинации.

Другие осуществления охватывают метод *in vivo* лечения млекопитающего, имеющего рак, выражающий AF-20; метод включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества описанной выше композиции. Композиция предпочтительно вводится после операции.

Дополнительное осуществление включает композицию, пригодную для *in vivo* или *in vitro* выявления рака; композиция включает эффективное для диагностики количество гуманизированного или химерного антитела, гуманизированного фрагмента антитела или полипептида, описанных здесь. Предпочтительно гуманизированное или химерное антитело, гуманизированный фрагмент антитела или полипептид, непосредственно или косвенно, ассоциированы или связаны с обнаружимой меткой. Более предпочтительно обнаруживаемая метка - радионуклид, флюоресцентное вещество, фермент, субстрат фермента, кофактор фермента, ингибитор фермента или лиганд. Предпочтительные радионуклиды включают ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{86}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{177}Lu , и их смеси и комбинации.

Дальнейшие осуществления включают метод для *in vitro* иммунологического обнаружения выражающих AF-20 раковых клеток, включающий контакт раковых клеток с композицией, описанной выше. В этом осуществлении, гуманизированные или химерные антитела, гуманизированный фрагмент антитела или полипептиды композиций преимущественно связаны с твердой основой.

Другой предпочтительный способ включает метод *in vivo* иммунологического обнаружения выражающих AF-20 раковых клеток у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного для диагностики количества композиции, описанной выше, для обнаружения рака. Процедура иммунологического детектирования является предпочтительной для *in vivo* визуализации опухоли.

Дополнительное осуществление включает метод *in vivo* лечения рака; метод включает (i) внутривенное введение антитела, фрагмента антитела или полипептида, меченных радионуклидом, (ii) после-

дующее обнаружение опухолевой клетки, используя зонд активности радионуклида, и (iii) последующее удаление обнаруженной опухолевой клетки хирургическим путем. Предпочтительно, антитело или полипептид являются гуманизированным или химерным антителом, гуманизированным фрагментом антитела или полипептидом, описанным выше. Предпочтительные радионуклиды - ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{86}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}In , ^{177}Lu , или их смеси и комбинации.

Осуществления изобретения включают далее метод использования гуманизированного или химерного антитела, гуманизированного фрагмента антитела или полипептида, описанных выше или молекулу ДНК, описанную выше, для получения полипептидов или вариантов или производных антител, фрагментов или полипептидов, которые связывают АФ-20. Предпочтительно метод получения полипептидов, вариантов или производных является технологией визуализации: фага или дрожжей.

Осуществления данного изобретения объяснены с помощью следующих примеров, не ограничивающих сущность изобретения.

Примеры

Пример 1. Секвенирование генов крысиного антитела.

Крысиную гибридому AD20D4 восстанавливали и культивировали в Модифицированной Далбекко Среде Иглса с Глутамаксом I, (Invitrogen Corp. Cat. No. 61965-026, Lot. No. 3070663) (к которой добавляли 20%-ную эмбриональную сыворотку быка североамериканского происхождения (Invotrogen Corp. Cat. No. 16000-044, Batch No. 1137907) и 1 ммоль пирувата натрия Cat. No. 11360-039, Lot No. 3069371).

Полную РНК готовили из 107 клеток гибридомы, остерегаясь загрязнения РНК-азами. Использовали специальные реагенты, свободные от РНК-аз, включая воду, свободную от нуклеазы. Для выделения, клетки осаждали центрифугированием на рефрижераторной центрифуге MSE 2000R, при 4°C и скорости 1500 оборотов в минуту, в течение 5 мин, после этого клетки промывали три раза в ледяном PBS. Далее клетки снова суспендировали в 6 мл ледяного РНК-лизирующего буфера (0,14 моль NaCl, 1,5 ммоль MgCl_2 , 10 ммоль Трис pH 8,6, 0,5% NP-40), к которому добавляли 5 л РНК-азу OUT и смесь перемешивали в течение десяти секунд. Этот раствор наслаивали на равный объем 24% (вес/объем) раствора сахарозы и 1% раствора NP-40 и инкубировали на льду в течение пяти минут. После этого раствор центрифугировали на скорости 4000 об./мин в течение 30 мин при 4°C на рефрижераторной центрифуге. Верхнюю цитоплазматическую фазу удаляли и переносили в равном объеме 2 X PK буфера (0,3 моль NaCl, 0,025M ЭДТА, 0,2M Трис pH 7,5, 2% SDS), к которому добавляли протеиназу К (Life Technologies Cat. No. 25530-049) до конечной концентрации 200 мкг/мл. Раствор инкубировали при 37°C в течение 30 мин.

После этого раствор экстрагировали равным объемом фенола/хлороформа (1:1 (вес/объем)). К водной фазе добавляли 2,5 объема 100%-ного этанола и раствор хранили при -20°C в течение ночи. РНК выделяли центрифугированием (400 об./мин в течение 30 мин) и высушивали в вакуум-эксикаторе. РНК растворяли в H_2O (Promega Cat. No. PI 19C) и концентрацию измеряли спектрометрическим методом, принимая, что $A_{260} 1 = 40$ мг/мл. Для проверки качества РНК, 1-2 пикограмма пропускали через 1,2% гель агарозы в ТАЕ: высококачественная РНК показывает острые полосы рибосом без признаков деградации.

V_N и V_K кДНК готовили, используя обратную транскриптазу с IgG постоянной областью мыши и праймерами К постоянного региона мыши, остерегаясь загрязнения с РНК-азами. Сначала приготовили переменную область нити кДНК, смешивая в пробирке микроцентрифуги 5 мкг РНК, 10 мкл 5 × буфера обратной транскриптазы (Promega Cat. No. M351A), 1 мкл праймера (25 пикомоль/мкл в H_2O (Promega Cat. No. P119C), используя MuIgGVH3' (Oligo № 152) для тяжелой цепи; MuIgKVL3' (Oligo № 160) для легкой цепи), 2 мкл 10 ммоль раствора dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 ммоль каждый, из 100 ммольного исходного раствора (Life Technologies Cat. No. 10297018), 2 мкл РНК-азу OUT (Life Technologies Cat. No. 10777019) и H_2O (Promega Cat. No. PI 19C) до 50 мкл. Раствор нагревали при 70°C в течение 10 мин и медленно охлаждали до 37°C. Добавляли 100 единиц M-MLV обратной транскриптазы (Promega Cat. No. M530A), и раствор инкубировали при 37°C в течение одного часа, далее нагревали при 70°C в течение 15 мин и хранили при -20°C до следующего использования.

После этого выполняли амплификацию и клонирование генов переменных областей. В пробирке микроцентрифуги смешивали 5 мкл кДНК первой нити, 5 мкл 10 × буфера Taq полимеразы (Life Technologies Cat. No. 402028), 1 мкл 3' праймера (25 пикомоль/мкл в H_2O , используя MuLgVH3' (oligo № 152) для тяжелой цепи; MuLgKVL3' (Oligo № 160) для легкой цепи), 1 мкл 5' направляющего праймера (25 пикомоль/мкл каждого праймера в смеси), 1 мкл 10 ммольный раствор dNTPs, 0,51 л буфера Taq полимеразы (Life Technologies Cat. No. 10342-020) и H_2O до 50 мкл. Все реактивы, кроме фермента Taq, смешивали в тонкостенной PCR пробирке объемом 0,5 мл и нагревали при 94°C на блоке PCR. После этого добавляли фермент Taq и образцы подвергали обработке при циркуляции: при 94°C/2 мин, 40 циклов при 94°C/30 с, при 50°C/30 с, при 72°C/2 мин, заканчивающаяся при 72°C в течение 5 мин. Чтобы удостовериться, что PCRs дали продукты ожидаемого размера (приблизительно 350 bp), 5 мкл из каждой реакционной смеси пропускали через гель агарозы. Остаток продукта наносили на 1,5%-ную гель агарозы низкой точки плавления и полосы ДНК вырезали и очищали. Очищенную на геле V область ДНК лидировали в 1 мкл pGem T-свободного вектора клонирования (Promega Cat. No. A1360), смешивая с 2 мкл буфе-

ром 10 × T4 ДНК лигазы (Promega Cat. No. C126B) и 1 мкл T4 ДНК лигазы (Promega Cat. No. M180A), после этого инкубировали при 15-20°C в течение двух часов или в течение ночи. Вектор был трансформирован в компетентный TG1 *E. coli* и нанесен на планшеты LB + IPTG + XGAL + ампициллин. Белые колонии, с 3 мл LB + ампициллином, помещали в универсальные контейнеры и выращивали при 37°C. После 2-4 ч путем анализа PCR проверяли вставки. 50 мкл культуры переносили в пробирке микроцентрифуги и нагревали при 95°C в течение пяти минут. Далее центрифугировали на микроцентрифуге в течение пяти минут и супернатант переносили в новую пробирку. С 10 мкл супернатанта смешивали 5 мкл 10 × буфера Taq полимеразы, 1 мкл направляющего праймера M13, 1 мкл обратного праймера M13, 1 мкл 10 ммоль dNTPs, 0,5 мкл Taq полимеразы и H₂O до 50 мкл.

Все реактивы кроме Taq фермента смешивали в тонкостенной пробирке PCR объемом 0,5 мл и нагревали при 94°C на блоке PCR. После этого добавляли фермент Taq и образцы подвергали обработке при циркуляции: при 94°C/2 мин, 40 циклов при 94°C/30 с, при 50°C/30 с, при 72°C/2 мин, заканчивающаяся при 72°C в течение 5 мин. Чтобы проверить вставки (полоса при 500 bp), 10 мкл из каждой реакционной смеси пропускали через гель агарозы. Культуры выращивали в течение ночи и ДНК готовили для секвенирования.

Последовательность ДНК отобранных клонов (V_H и V_K клоны, визуализированные PCR для вставок ожидаемого размера) определяли автоматизированным секвенированием ДНК. Плазмидную ДНК готовили из отобранного путем скрининга бактериального штамма. 5 мл культур выращивали в жидкой питательной среде Лурия (LB) (Nad 10 г, триптофан 10 г, дрожжевой экстракт 5 г в литре H₂O) с добавкой 50 мкг/мл (или как требуется) ампициллина (Sigma Cat. No. A-0166) (50 мг/мл в H₂O) в универсальных контейнерах. Культуры выращивали в условиях качания в течение ночи или в течение по крайней мере 5 ч. Культуры выделяли центрифугированием в микроцентрифуге и ДНК очищали, используя комплект Wizard Plus SV для работы с микроколичествами препаратов (Promega Cat. No. A1460), согласно инструкции изготовителя. После этого очищенная ДНК была снова суспендирована в 100 мкл H₂O и секвенирована с помощью автоматизированного оборудования для секвенирования ДНК.

ДНК и аминокислотная последовательность для V области NYR-1002 тяжелой цепи показаны на фиг. 1. Из первой партии клеток не были изолированы никакие продуктивные гены тяжелой цепи. Из второй партии пятнадцать независимых клонов дали идентичные полные последовательности тяжелой цепи. Локация CDRs была определена относительно других последовательностей антитела (Kabat EA et al., 1991). CDRs обозначены по SEQ ID No. 47 (CDR1), 48 (CDR2) и 49 (CDR3). NYR-1002 V_H аминокислотная последовательность была сравнена с консенсусной последовательностью для подгруппы IIB Тяжелой Цепи Мыши и была отнесена к этой подгруппе.

ДНК и аминокислотная последовательность для V области NYR-1002 легкой цепи показаны на фиг. 2. Пять независимых клонов от каждого штамма клеток дали идентичные последовательности. Локация CDRs была определена относительно других последовательностей антитела (Kabat EA et al., 1991). CDRs обозначены по SEQ ID No. 44 (CDR1), 45 (CDR2) и 46 (CDR3). NYR-1002 V_L аминокислотная последовательность была сравнена с консенсусной последовательностью для подгруппы V Цепей Каппа Мыши и была отнесена к этой подгруппе.

Пример 2. Конструкция генов химерного антитела и химерного антитела

Химерное антитело было сконструировано путем связывания крысиных переменных областей, идентифицированных выше, в примере 1, с человеческими постоянными областями. Крысиные переменные области были добавлены методом перекрытия PCR рекомбинации, как описано у Orlandi et al. (1989). См. также Daugherty B.L. et al. (1991). Клонированные крысиные гены, V_H и V_K, были амплифицированы. Векторы V_H-PCR1 и V_K-PCR1 (Riechmann et al. 1988) использовали как матрицы, чтобы ввести 5'-фланкирующую последовательность, лидерный интрон, промотор крысиного иммуноглобулина и 3'-фланкирующую последовательность, включая участок сплайсирования и последовательности интрона. Полученные кассеты экспрессии V_H и V_K были клонированы в pUC 19, а правильность полной последовательности ДНК была подтверждена путем секвенирования. Амплификация PCR проводилась следующим образом: был синтезирован комплект мутагенных олигонуклеотидов, всего 25 пикомоль/мкл. Этот комплект охватывал сайт, предназначенный для такой мутации, что последовательность ДНК амплифицируется как комплект фрагментов. Смежные олигонуклеотиды были спроектированы в зависимости от числа сайтов, предназначенных для мутации.

PCR амплификации были проведены для каждой праймерной пары: 1 мкл матричной ДНК была смешана с 5 мкл 10 × буфером Pfu полимеразы (Stratagene Cat. No. 600153-82 или Promega Cat. No. M776A), 1 мкл (25 пикомоль/мкл) направляющего праймера, 1 мкл (25 пикомоль/мкл) обратного праймера, 2 мкл 10 ммоль dNTPs, 0,5 мкл (1 единица) Pfu ДНК полимеразы (Stratagene Cat. No. 600252-51 или Promega Cat. No. M774A) и H₂O до 50 мкл. Эти 5'- и 3'-праймеры включали терминал 18 bp случайной последовательности. Все реактивы, кроме Pfu фермента, были смешаны в тонкостенной PCR пробирке объемом 0,5 мл и нагреты при 94°C на блоке PCR. После этого добавляли фермент Pfu и подвергали образцы обработке при циркуляции: при 94°C/2 мин, 15-20 циклов при 94°C/30 с, при 50°C/30 с, при 72°C/2 мин (в зависимости от длины требуемой экстензии), заканчивающейся при 72°C в течение 5 мин. Темпе-

ратура гибридизации была отрегулирована таким образом, что она была выше или ниже 50°C, в зависимости от Tm олигомеров. Чтобы удостовериться, что образовались продукты ожидаемого размера, 5 мкл из каждой реакционной смеси пропускали через гель агарозы. В противном случае, температура гибридизации была понижена на 5°C, число циклов PCR было увеличено, и/или концентрация MgCl₂ была увеличена до 5 ммоль. Если этот круг PCR приводил к многократным полосам, необходимо было очистить целевую полосу при помощи геля соответствующего размера.

Продукты вступили во вторую реакцию PCR, с использованием во втором круге 5'- и 3'-праймеров, включающих терминал с 18 bp, добавленный в первом круге PCR. Матрицей для второго PCR-соединения являются фрагменты, образование которых в первом круге отрегулировано таким образом, что их следует добавить приблизительно в равных количествах. Продукты первого круга PCR были смешаны с 5 мкл 10 × буфера Pfu полимеразы (Stratagene Cat. No. 600153-82 или Promega Cat. No. M776A), 2 мкл (50 пикомоль/мкл) 5'-праймера 2-го круга, 2 мкл (50 пикомоль/мкл) 3'-праймера 2-го круга, 2 мкл 10 ммоль dNTPs, 0,5 мкл (1 единица) Pfu ДНК полимеразы (Stratagene Cat. No. 600252-51 или Promega Cat. No. M774A) и H₂O до 50 мкл. Все реактивы, кроме Pfu фермента, были смешаны в тонкостенной PCR пробирке объемом 0,5 мл и нагреты при 94°C на блоке PCR. После этого добавляли фермент Pfu и образцы подвергали обработке при циркуляции: при 94°C/2 мин, 15 циклов при 94°C/30 с, при 50°C/30 с, при 72°C/1 мин (в зависимости от длины требуемой экстензии), заканчивающейся при 72°C в течение 5 мин. Чтобы удостовериться, что образовались продукты ожидаемого размера (приблизительно 820 bp для кассет экспрессии V_H и 650 bp для кассет экспрессии V_K), 5 мкл из каждой реакционной смеси пропускали через гель агарозы. В противном случае, вторую реакцию PCR повторяли, понижая температуру гибридизации на 5°C и/или увеличивая число циклов PCR. Продукты PCR были извлечены и осаждены, используя фенол/хлороформ и этанол, или Qiagen MiniElute PCR Purification kit (Cat. No. 28004). Полученный продукт был гидролизован соответствующими ферментами (HindIII и BstNI для кассет экспрессии) и нанесен на 1,5% гель агарозы низкой точки плавления. Полосы ДНК правильного размера были вырезаны и очищены. ДНК была секвенирована, чтобы подтвердить ее истинность и отсутствие поддельных мутаций.

Гены V-области тяжелой и легкой цепи были перенесены к векторам экспрессии pSVgpt и pSVhyg, которые соответственно включают человеческий IgG1 или K постоянные области и маркеры для селекции в клетках млекопитающих. Вектор Экспрессии Тяжелой Цепи Антитела иллюстрирован на фиг. 6. Помещенные в скобки участки на фигуре были удалены. Вектор экспрессии тяжелой цепи pSVgptHuIgG1 базируется на pSV2gpt (Mulligan и Berg, Science (1980; 209: 1422-1427)). Он включает ген резистентности ампициллина для селекции в бактериальных клетках, gpt ген для селекции в клетках млекопитающих, область энхансера иммуноглобулина крысиной тяжелой цепи, геномную последовательность, кодирующую постоянную область гена IgG1 человека и SV40 поли-A последовательности. Тяжелая область переменной цепи для экспрессии вставлена как HindIII к фрагменту BstNI. Эта кассета экспрессии включает промотор крысиной тяжелой цепи, последовательность, кодирующую сигнальный пептид и интрон последовательности сигнала, ген V_H, донорную последовательность V-C сплайсинга и последовательности интрона.

Вектор Выражения Легкой Цепи Антитела иллюстрирован на фиг. 7. Помещенные в скобки сайты на фигуре были удалены. Показаны сайты 3EcoRI, внутренние относительно HuC_K. Легкий вектор экспрессии цепи pSVgptHuC_K базируется на векторе pSVhyg. Он включает ген резистентности ампициллина для селекции в бактериальных клетках, hyg ген для селекции в клетках млекопитающих, область энхансера иммуноглобулина крысиной тяжелой цепи, геномную последовательность, кодирующую постоянную область гена каппа человека и SV40 поли-A последовательности. Легкая область переменной цепи для экспрессии вставлена как HindIII к фрагменту BamHI. Эта кассета экспрессии включает промотор крысиной тяжелой цепи, последовательность, кодирующую сигнальный пептид и интрон последовательности сигнала, ген V_K, донорную последовательность V-C сплайсинга и последовательности интрона. Истинность последовательности ДНК была подтверждена для V_H и V_K, в химерных векторах экспрессии.

Векторы экспрессии тяжелой и легкой цепи были совместно трансфектированы в NSO клетки (European Collection of Animal Cell Cultures (Европейская Коллекция Клеточных Культур Животных), Porton, UK, ECACC No. 85110503) путем электропорации. PvuI гидролизует приблизительно 3 и 6 мкг pSVgptHuIgG1 и pSVgptHuC плазмид, соответственно. Гидролизованная ДНК была осаждена этанолом и растворена в 20 мкл (dH₂O). Клетки были повторно суспендированы из полуконфлюэнтных колб, объемом 75 см³, и собраны центрифугированием при 1000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант был удален. Клетки были повторно суспендированы в 0,5 мл Модифицированной Далбекко Среде Иглса (DMEM) и перенесены в кювету Генного Пульсатора (Bio-Rad). ДНК была смешана с клетками путем осторожного пипетирования и оставлена на льду в течение 5 мин. Кювета была помещена между электродами Генного Пульсатора Bio-Rad и был приложен отдельный импульс 170 V, 960 мкФ. Кювета снова была помещена на льду в течение 20 мин. После этого суспензия клеток была перенесена в 75 см³ колбах, содержащих 20 мл DMEM и инкубирована в течение 1-2 дней. После этого клетки были собраны и повторно суспендированы в 80 мл селективного DMEM и аликвотные пробы объемом 200 мкл были помещены в 96 лунках микротитровального планшета.

Приблизительно 10 дней спустя, 20 мкл среды из каждой лунки были анализированы на наличие человеческих антител. Были выбраны лунки для экспансии, исходя из уровня образования антитела и числа клеток в лунке. Из выбранных лунок клетки были повторно суспендированы, путем трения наколника пипетки системы Gilson P200 (с желтым наконечником) поперек поверхности, и среда была перенесена в лунку планшета для тканевых культур с 24 лунками, содержащей 1,5 мл свежего селективного DMEM. Колонии, выражающие gpt ген, были отобраны в DMEM, который был дополнен 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой, 0,8 мкг/мл микофеноловой кислоты и 250 мкг/мл ксантина. Для получения человеческого антитела, трансфектированные клоны были визуализированы с помощью ELISA для IgG человека. Линии клеток выделяющие антитело были расширены, самые высокопродуктивные были отобраны и заморожены жидким азотом. Химерное антитело было очищено, используя Prosep®-A (Millipore Corp.). Концентрация была определена при помощи ELISA для IgG₁ человека.

Пример 3. Идентификация эпитопов Т-клеток-хелперов человека, содержащихся в пределах переменных областей мыши, NYR-1002.

Определенные в примере 1 аминокислотные последовательности были проанализированы для создания карт переменной области эпитопов Т-клеток, используя программное обеспечение Peptide Threading software (Biovation). Фиг. 5 показывает результаты этого анализа. В NYR-1002 анализ выявил 17 потенциальных эпитопов Т-клеток человека, 9 в V_H и 8 в V_K. Оказалось, что ни один из потенциальных эпитопов Т-клеток полностью не совпадает с CDR.

Пример 4. Проектирование модифицированных последовательностей антитела.

Варианты первичных последовательностей V_H и V_K (NYDIVH1, NYDIVK1) были разработаны путем замещения аминокислотных остатков в переменных областях крысиного AF-20 антитела, чтобы удалить потенциальные эпитопы Т-клеток человека, но сохранить, где требуется, критические аминокислоты: см. фиг. 6, 7, 8 и 9. ДНК и аминокислотные последовательности для первичной области V_H показаны на фиг. 8, а для первичной области V_K на фиг. 9.

Поскольку поколение различных первичных V_H и V_K последовательностей требовало небольшого количества аминокислотных замен, которые, возможно, влияют на связывание заключительного полипептида, то были разработаны варианты шести других V_Hs (обозначенных, как NYDIVH1A, NYDIVH2, NYDIVH3, NYDIVH4, NYDIVH5 и NYDIVH6), и 4 других V_Ks (обозначенных, как NYDIVK2, NYDIVK3, NYDIVK4, и NYDIVK5). Сравнительные аминокислотные последовательности крысиной и деиммунизированной V области показаны на фиг. 6 для V_H и на фиг. 7 для V_K. Измененная аминокислотная последовательность для вариантов V_H и V_Ks заново интродуцирует незначительный потенциал эпитопов Т-клеток (табл. 1 фиг. 6 и 7, соответственно).

Пример 5. Конструирование модифицированных последовательностей антитела.

Модифицированные переменные области были конструированы методом перекрытия PCR комбинации, как описано у Orlandi et al., (1989), и как детализировано выше, в примере 2. Клонированные крысиные V_H и V_K гены использовались в виде матриц для мутагенеза областей каркаса до требуемых последовательностей. Комплекты мутагенных праймеров синтезировались, охватывая области, предназначенные для изменений. Векторы V_H-PCR1 и V_K-PCR1 (Riechmann et al., 1988) использовались в качестве матриц для введения 5'-фланкирующей последовательности, включающей последовательности пептида лидерного сигнала, лидерный интрон, промотор крысиного иммуноглобулина, 3'-фланкирующую последовательность включающую сайт сплайсинга, и последовательности интрона. Полученные модифицированные V_H и V_K кассеты экспрессии были клонированы в pUC 19, и истинность полной последовательности ДНК была подтверждена для каждой модифицированной V_H и V_K последовательности.

Модифицированные гены V-области тяжелой и легкой цепи были вырезаны из pUC19 в виде кассет экспрессии HindIII к BamHI. Они были перенесены в векторы экспрессии pSVgpt и pSVhyg (фиг. 3 и 4 соответственно), которые включают IgG1 человека или К постоянные области, соответственно и маркеры для селекции в клетках млекопитающих. Истинность последовательности ДНК была подтверждена для модифицированных V_H и V_K последовательностей в векторах экспрессии.

Линия клетки хозяина для выражения антитела представляла собой NSO -миелома мыши, не производящая иммуноглобулин - полученная от Европейской Коллекции Клеточных Культур Животных, Rottom UK (ECACC No. 85110503). Векторы экспрессии тяжелой и легкой цепи были совместно трансфектированы в NSO клетки путем электропорации (см. пример 2, выше). Колонии, выражающие gpt ген были отобраны в Модифицированной Далбекко Среде Иглса (DMEM), к которой была добавлена 10%-ая эмбриональная бычья сыворотка, 0,8 мкг/мл микофеноловой кислоты и 250 мкг/мл ксантина. Трансфектированные клоны клеток были визуализированы с помощью ELISA для IgG человека, для получения человеческого антитела. Линии клеток, выделяющие антитело, были расширены, самые высокопродуктивные были отобраны и заморожены жидким азотом. Модифицированные антитела были очищены, используя Prosep®-A (Bioprocessing Ltd). Концентрация была определена при помощи ELISA для IgG₁ человека. Антитела были проанализированы также методом SDS-PAGE.

Пример 6. Экспрессия модифицированных антител.

Трансфектированные клоны клеток были проверены на экспрессию антитела. В случае использования комбинаций большинства тяжелых и легких цепей выходы были низкие (см. фиг. 10). Комбинация NYDIVH5 и NYDIVK2 была лучшим производителем, производя 3,6 мг очищенного антитела. Для сравнения, химерное антитело давало 0,66 мг очищенного белка. Комбинация NYDIVH1A и любой легкой цепи не производила никакого антитела.

Антитела, включающие NYDIVH2/NYDIVK2, NYDIVH2/NYDIVK3 давали наилучшие результаты, однако в комбинациях с NYDIVH4/NYDIVK5, NYDIVH4/NYDIVK3 результат был немного ниже. NY-DIVH2/NYDIVK2 был отобран в качестве образцового гуманизированного антитела.

Пример 7. Анализ модифицированного антитела и химерного антитела с помощью Т-клеток человека.

Гуманизированное антитело NYDIVH2/NYDIVK2 (huNYR-1002) вместе с химерным антителом (chNYR-1002) было проанализировано методом пролиферации Т-клеток человека. Для выделения одноядерных клеток периферийной крови, (PBMC), содержащих антиген-представляющие клетки (APCs) и Т-клетки, использовались лейкоцитные плёнки от здоровых доноров. Были определены МНС аллотипы класса II этих доноров и отобраны 20 доноров с результатом > 80% HLA DRB 1 аллотипов Кавказского населения. Как показано в табл. 1 фиг. 11, ни один из 20 доноров не давал существенный ответ на гуманизированное антитело huNYR-1002 (индекс стимуляции, SI > 2), при анализе методом пролиферации Т-клеток человека. По сравнению с этим, 12 доноров давали ответ на IgG крысы, chNYR-1002, с индексом стимуляции SI's > 2, хотя 5 из этих доноров давали ответы, граничащие с индексом стимуляции 2-2.5 (табл. 2, фиг. 11). Ясный отличительный ответ на гуманизированное антитело подтверждает, что аминокислотные замены в крысиных переменных областях влияют на снижение иммуногенности Т-клеток.

Пример 8. Определение цитотоксической эффективности модифицированного антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом.

Антитело (huNYR-1002) было конъюгировано с различными известными цитотоксическими молекулами и испытано на цитотоксические эффекты в культурах раковых клеток. Цитотоксические соединения (типа метотрексата и доксорубигина) были конъюгированы с антителом, активизированным малеимидом, используя сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат и очистку методом хроматографии с исключением размера молекул.

При замещении были использованы следующие соотношения реагирующих компонентов: 2-10 молей соединения на моль антитела.

вариации методики конъюгации рассмотрены в осуществлениях, раскрытых здесь, и легко выполняемы специалистами при использовании приведенных здесь руководящих принципов;

вариации по выбору конъюгированной цитотоксической молекулы рассмотрены в осуществлениях, раскрытых здесь, и находятся в пределах компетенции специалиста, использующего приведенные здесь руководящие принципы.

96-Лунковые микротитровальные планшеты были засеяны клетками (напр., клетки CCL-185), по 103-105 клеток/на лунку. Лунки периметра были свободны от клеток. Пустые контрольные лунки были заполнены одним соединением, одной средой, и средой плюс соединением. Контроль также включал варианты: клетки плюс среда, и клетки отдельно. Соединения испытывались в диапазоне концентраций 0,01-0,25 мкг/мл. Планшеты были инкубированы в течение 4 дней и затем были анализированы различными тестами по жизнеспособности, согласно руководствам изготовителей, (напр., Celltiter 96 Aqueous One Solution (MTS)). После прибавления красителя или реагента к лункам с клетками планшеты были инкубированы в течение 1-4 ч при 37°C, перемещены в течение нескольких секунд и затем фотометрированы сканирующим спектрофотометром для прочтения планшетов.

Результаты

Оказалось, что свежеприготовленные соединения (конъюгаты антитела с цитотоксической молекулой) являются более токсическими (в пересчете на моль цитотоксического соединения), чем неконъюгированные цитотоксические соединения.

Повышенная цитотоксичность соединения, конъюгированного с антителом, была в 10^{-10^4} раз выше его потенциальной токсичности (для одинакового цитотоксического эффекта, по сравнению с соединением, конъюгированным с антителом, требовалось в 10^{-10^4} раз больше неконъюгированных молекул того же соединения). Максимальный эффект проявлялся после 4 дней культивирования. Эти результаты показывают, что 1) конъюгаты антитела обеспечивают одинаковую цитотоксичность при более низких концентрациях цитотоксического соединения, что указывает на меньшую токсичность к незлокачественным клеткам и тканям, с которыми антитело связывается менее активно; 2) конъюгаты антитела были более цитотоксическими при более низких концентрациях, что указывает на большую эффективность при уничтожении раковых клеток; и 3) цитотоксические соединения, изолированные и конъюгированные с моноклональным антителом, проявляют меньшую токсичность к незлокачественным клеткам и тканям, с которыми антитело связывается менее активно.

Сокращения

AF-20 - ассоциированный с опухолью антиген = антиген клеток аденокарциномы
 AF-20 mAb - нечеловеческое антитело, способное связываться с AF-20 антигеном = крысиное моноклональное антитело
 AFP - альфа-фетопротейн
 AML - острая миелоидная лейкемия
 ATCC - американская коллекция типов культур
 CD-антиген - антиген, определяющий комплементарность
 CDR - нечеловеческая область последовательности = область, определяющая комплементарность
 EGFR - эпидермальный рецептор фактора роста
 Fc - постоянная область интактного антитела
 FITC - флюоресцеин-изотиоцианат
 FOBT - определение скрытой крови в кале
 FOCUS - линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы
 FR - область каркаса
 HBV - В вирусный гепатит
 HCC - гепатоцеллюлярная карцинома человека
 HCV - С вирусный гепатит
 HER2 - рецептор эпидермального фактора роста 2 человека
 mAbs - моноклональные антитела
 MRI - магнитно-резонансная визуализация
 NHL - не-Ходжкиновая лимфома
 NYR-1002 - крысиное антитело, произведенное линией клеток гибридомы
 PCR - реакция цепи полимеразы
 USPSTF - Профилактическая Целевая группа Услуг США
 VEGF - сосудистый эндотелиальный фактор роста
 V_H - переменная область тяжелой цепи
 V_L - переменная область легкой цепи
 V_R - переменная область легкой или тяжелой цепи антитела

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула антитела, включающая связывающие антиген области, полученные из тяжелых или легких областей переменной цепи антитела, которое способно связывать AF-20.
2. Химерное антитело, включающее переменные области, полученные из нечеловеческого антитела, которое связывает AF-20 и человеческие постоянные области.
3. Химерное антитело согласно п.2, включающее переменные области, полученные из крысиного антитела, которое связывает AF-20 и человеческие постоянные области.
4. Химерное антитело согласно п.3, отличающееся тем, что крысиным антителом является крысиное моноклональное антитело (mAb), произведенное линией клеток гибридомы ATCC, обозначенной HB 9686 и человеческой постоянной областью.
5. Химерное антитело chNYR-1002, где химерным антителом является chNYK-1002.
6. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела, который связывает AF-20, отличающееся тем, что указанное гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела получен из нечеловеческого антитела, которое связывает AF-20.
7. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела (humAb) согласно п.6, отличающееся тем, что humAb получен из крысиного моноклонального антитела (mAb), который связывает AF-20.
8. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела (humAb) согласно п.7, отличающееся тем, что humAb получен из крысиного mAb, произведенного линией клеток гибридомы ATCC, обозначенной HB 9686.
9. Гуманизированное антитело NYR-1002, где гуманизированным антителом является huNYR-1002.
10. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела, который связывает AF-20, включающий области, определяющие комплементарность (CDRs) аминокислотных остатков, которые получены из нечеловеческого антитела, связывающего AF-20 и аминокислотных остатков человеческих Областей Каркаса (FRs).
11. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела согласно п.10, отличающееся тем, что области, определяющие комплементарность (CDRs) аминокислотных остатков, получены из крысиного mAb, который связывает AF-20.
12. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела согласно п.11, отличающееся тем, что крысиный mAb, который связывает AF-20, произведен линией клеток гибридомы ATCC, обозначенной HB 9686 и аминокислотными остатками человеческих Регионов Каркаса (FRs).

13. Гуманизированное антитело или его фрагмент, который связывает AF-20, отличающееся тем, что регионы, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) легкой области переменной цепи и регионы, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) тяжелой области переменной цепи, состоят из следующих аминокислотных последовательностей:

легкая цепь:

CDR1 (SEQ ID NO: **44**) [RASQS1GTSIH];

CDR2 (SEQ ID No. **45**) [YASESIS]; и

CDR 3 (SEQ ID No. **46**) [QQSSSWPFT];

тяжелая цепь:

CDR 1 (SEQ ID NO: **47**) [GYTFAGHYVH];

CDR2 (SEQ ID No. **48**) [WIFPGKVNTKYNEKFKG]; и

CDR3 (SEQ ID No. **49**) [VGVDYPYYFDY].

14. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела согласно п.13, отличающееся тем, что в человеческих областях каркаса (FRs) выполнены одно или более дополнений, замещений или делеций аминокислотных остатков.

15. Гуманизированное антитело или фрагмент согласно п.13, отличающееся тем, что потенциальные эпитопы Т-клеток-хелперов человека, идентифицированные в переменных областях, были удалены замещением, дополнением или делецией аминокислотных остатков.

16. Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела согласно п.6, отличающееся тем, что антитело обладает склонностью связывать антиген AF-20, которая составляет по крайней мере 10% склонности антитела, из которого были получены гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела.

17. Молекула ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность гуманизированного антитела или фрагмента, согласно п.13.

18. Молекула ДНК, кодирующая легкую цепь антитела или фрагмента, согласно п.6.

19. Молекула ДНК согласно п.18, где в областях, определяющих комплементарность, легкая цепь включает следующие аминокислотные последовательности:

CDR1 (SEQ ID No: **44**) [RASQS1GTSIH];

CDR2 (SEQ ID No: **45**) [YASESIS]; и

CDR3 (SEQ ID No: **46**) [QQSSSWPFT].

20. Молекула ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела или фрагмента, согласно п.6.

21. Молекула ДНК согласно п.20, где в областях, определяющих комплементарность, тяжелая цепь включает следующие аминокислотные последовательности:

CDR1 (SEQ ID No: **47**) [GYTFAGHYVH];

CDR2 (SEQ ID No: **48**) [WIFPGKVNTKYNEKFKG]; и

CDR3 (SEQ ID No: **49**) [VGVDYPYYFDY].

22. Вектор экспрессии, содержащий молекулу ДНК, согласно п.19.

23. Хозяин, трансформированный вектором экспрессии, согласно п.22.

24. Клетка хозяина, включающая рекомбинантную систему экспрессии, кодировавшую легкие и тяжелые цепи антитела или фрагмента антитела, согласно п.13.

25. Линия клеток гибридомы, которая производит химерное антитело, согласно п.2.

26. Линия клеток гибридомы, которая производит гуманизированное антитело или фрагмент антитела, согласно п.6.

27. Композиция для лечения рака, включающая терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела или фрагмента гуманизированного антитела, согласно п.6.

28. Композиция согласно п.27, отличающаяся тем, что гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела, непосредственно или косвенно, ассоциирован или связан с компонентом эффектора, обладающего терапевтической активностью.

29. Композиция согласно п.28, отличающаяся тем, что компонент эффектора отобран из группы, состоящей из противоопухолевого препарата, химиотерапевтического агента, цитотоксина, радионуклида, терапевтического фермента, пролекарства, цитокина, антипролиферативного агента, и их смесей.

30. Композиция согласно п.29, отличающаяся тем, что радионуклид отобран из группы, состоящей из ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{125}I , ^{131}I , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{153}Sm , ^{166}Dy , ^{175}Yb , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Os , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , и их смесей.

31. Способ лечения млекопитающего, страдающего от AF-20-экспрессирующего рака, включающий

введение млекопитающему терапевтически эффективного количества композиции, согласно п.29.

32. Способ согласно п.31, отличающийся тем, что композиция вводится после операции.

33. Композиция для обнаружения рака, включающая эффективное для диагностики количество гуманизированного антитела или фрагмента гуманизированного антитела, согласно п.6.

34. Композиция согласно п.33, отличающаяся тем, что гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела, непосредственно или косвенно, ассоциирован или связан с обнаруженной меткой.

35. Композиция согласно п.34, отличающаяся тем, что обнаруженная метка отобрана из группы, состоящей из радионуклида, флюоресцентного агента, фермента, субстрата фермента, кофактора фермента, ингибитора фермента, лиганда и их смесей.

36. Композиция согласно п.35, отличающаяся тем, что радионуклид отобран из группы, состоящей из ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{86}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{177}Lu и их смесей.

37. Способ иммунологического обнаружения AF-20-экспрессирующих раковых клеток, включающий контакт раковых клеток с композицией, согласно п.35.

38. Способ согласно п.37, отличающийся тем, что гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела композиции связан с твердой подложкой.

39. Способ иммунологического обнаружения AF-20-экспрессирующих раковых клеток у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного для диагноза количества композиции, согласно п.35.

40. Способ согласно п.39, отличающийся тем, что указанное иммунологическое обнаружение является визуализацией опухоли *in vivo*.

41. Способ лечения рака, включающий:

(i) внутривенное введение меченного радионуклидом гуманизированного антитела, или фрагмента гуманизированного антитела, согласно п.6;

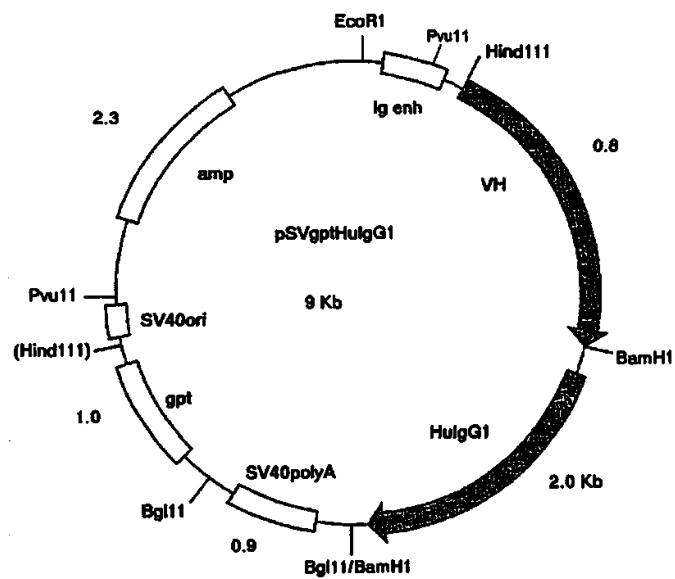
(ii) обнаружение опухолевых клеток, используя зонды активности радионуклида; и

(iii) удаление обнаруженных опухолевых клеток хирургическим путем.

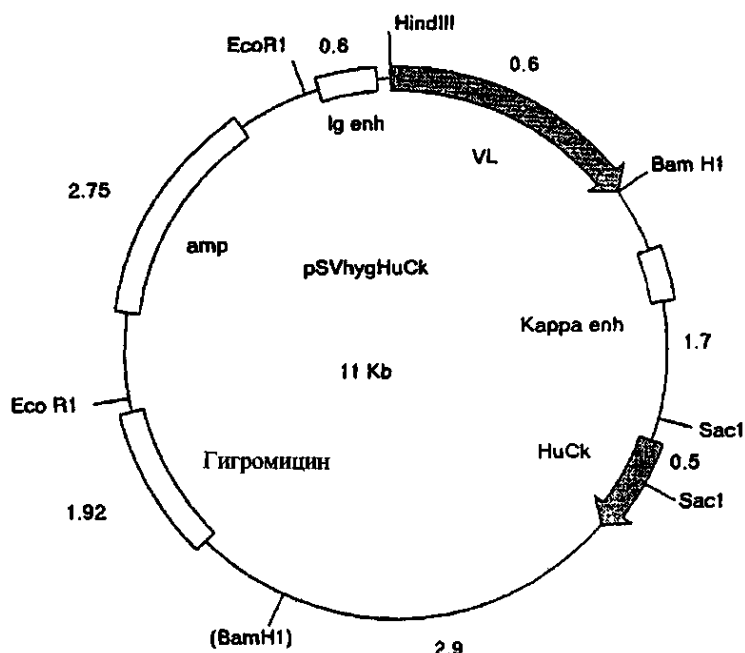
42. Способ согласно п.41, отличающийся тем, что радионуклид отобран из группы, состоящей из ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{86}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{177}Lu и их смесей.







Фиг. 3



Фиг. 4

V _H Регион			V _K Регион		
Позиция aa	Пептидная последовательность	% Совпадения с эталоном	Позиция aa	Пептидная последовательность	% Совпадения с эталоном
10	DLVKPGASVRISC	61	1	DILLTQSPAILSV	89
16	ASVRISCKASGYT	94	2	ILLTQSPAILSVS	28
32	HYVHWVKQRPGQG	33	11	LSVSPGDRVSFSC	67
35	HWVKQRPGQGLEW	94	17	DRVSFSCRASQSI	83
58	TKYNEKFKGKATL	67	34	HWYQQRNGSPRL	22
78	TAYMQLSSLTSED	61	71	FTLSINSVESEDV	67
81	MQLSSLTSEDSAV	61	76	NSVESEDVADYYC	78
84	SSLTSEDSAVYFC	89	81	EDVADYYCQSSS	61
108	DYWGQGTTLTVSS	33			

Фиг. 5

Таблица 1. Аминокислотные замены и потенциальные эпитопы, созданные в вариантах NYR-1002 V_H

Вариант	Кумулятивные замены остатков	Потенциальные эпитопы Т-клеток человека (% связывания аллотипов)
NYR-1002 V _H крысы	NA	10(61) 16(94) 32(33) 35(94) 58(67) 78(61) 81(61) 84(89) 108(33)
NYDIVH1A	нет	нет
NYDIVH1	81Q→E 82C→L 83T→R 87S→T91F→Y	нет
NYDIVH2	55T→V	нет
NYDIVH3	37T→V	32(33) 35(94)
NYDIVH4	91Y→F	32(33) 35(94) 84(89)
NYDIVH5	67T→A	32(33) 35(94) 58(67) 84(89)
NYDIVH6	83R→T	32(33) 35(94) 58(67) 78(61) 81(61) 84(89)

*нумерация по Kabat et al., 1991.

*потенциальный эпитоп первой аминокислоты, нумерация от аминокислоты Q №1→ аминокислоты A № 120

Фиг. 6

Таблица 2: Сравнение аминокислотных последовательностей вариантов NYR-1002 V_H крысы

	10	20	30
NYMUVH	Q V Q L Q Q S G P D L V K P G A S V R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH1A	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH1	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH2	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH3	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH4	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH5	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
NYDIVH6	Q V Q L Q Q S G P D L A K P G A S A R I S C K A S G Y T F A	30	
	40	50	60
NYMUVH	G H Y V H W V K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K V N T K Y	60	
NYDIVH1A	G H Y V H W T K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K T N T K Y	60	
NYDIVH1	G H Y V H W T K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K T N T K Y	60	
NYDIVH2	G H Y V H W T K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K V N T K Y	60	
NYDIVH3	G H Y V H W V K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K V N T K Y	60	
NYDIVH4	G H Y V H W V K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K V N T K Y	60	
NYDIVH5	G H Y V H W V K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K V N T K Y	60	
NYDIVH6	G H Y V H W V K Q R P G Q G L E W I G W I L P G K V N T K Y	60	
	70	80	90
NYMUVH	N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D	90	
NYDIVH1A	N E K F K G K T T L T A D K S S S T A Y M Q L S S E T S E D	90	
NYDIVH1	N E K F K G K T T L T A D K S S S T A Y M E L S S L R S E D	90	
NYDIVH2	N E K F K G K T T L T A D K S S S T A Y M E L S S L R S E D	90	
NYDIVH3	N E K F K G K T T L T A D K S S S T A Y M E L S S L R S E D	90	
NYDIVH4	N E K F K G K T T L T A D K S S S T A Y M E L S S L R S E D	90	
NYDIVH5	N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M E L S S L R S E D	90	
NYDIVH6	N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M E L S S L T S E D	90	
	100	110	120
NYMUVH	S A V Y F C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S	12	
NYDIVH1A	S A V Y F C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	
NYDIVH1	T A V Y Y C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	
NYDIVH2	T A V Y Y C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	
NYDIVH3	T A V Y Y C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	
NYDIVH4	T A V Y F C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	
NYDIVH5	T A V Y F C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	
NYDIVH6	T A V Y F C A R V G Y D Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S	12	

Таблица 1. Аминокислотные замены и потенциальные эпитопы, созданные в вариантах NYR-1002 V_K

Вариант	Кумулятивные замены остатков	Потенциальные эпитопы Т-клеток человека (% связывания аллотипов)
NYR-1002 V _K крысы	NA	1(89) 2(28) 11(67) 17(83) 34(22) 71(67) 76(78) 81(61)
NYDIVK1	нет	нет
NYDIVK2	31A→I	нет
NYDIVK3	54V→S	нет
NYDIVK4	73M→L	71(6)
NYDIVK5	42S→S	34(22) 71(6)

*нумерация по Kabat et al., 1991.

*потенциальный эпитоп первой аминокислоты, нумерация от аминокислоты D №1→ аминокислоты K № 107.

Фиг. 7

Таблица 2: Сравнение аминокислотных последовательностей вариантов NYR-1002 V_K крысы

	10										20										30											
NYMUVK	D	I	L	L	T	Q	S	P	A	I	L	S	V	S	P	G	D	R	V	S	F	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	30	
NYDIVK1	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	I	V	S	A	S	P	G	D	R	A	S	F	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	30	
NYDIVK2	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	I	V	S	A	S	P	G	D	R	A	S	F	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	30	
NYDIVK3	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	I	V	S	A	S	P	G	D	R	A	S	F	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	30	
NYDIVK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	I	V	S	A	S	P	G	D	R	A	S	F	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	30	
NYDIVK5	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	I	V	S	A	S	P	G	D	R	A	S	F	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	30	
	40										50										60											
NYMUVK	T	S	I	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	G	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S	G	I	P	S	60	
NYDIVK1	T	S	A	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	S	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	V	I	S	G	I	P	S	60	
NYDIVK2	T	S	I	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	S	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	V	I	S	G	I	P	S	60	
NYDIVK3	T	S	I	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	S	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S	G	I	P	S	60	
NYDIVK4	T	S	I	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	S	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S	G	I	P	S	60	
NYDIVK5	T	S	I	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	G	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S	G	I	P	S	60	
	70										80										90											
NYMUVK	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I	N	S	V	E	S	E	D	V	A	D	Y	Y	C	Q	Q	90	
NYDIVK1	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	M	S	I	N	S	T	E	S	E	D	T	A	D	Y	Y	C	Q	Q	90	
NYDIVK2	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	M	S	I	N	S	T	E	S	E	D	T	A	D	Y	Y	C	Q	Q	90	
NYDIVK3	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	M	S	I	N	S	T	E	S	E	D	T	A	D	Y	Y	C	Q	Q	90	
NYDIVK4	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I	N	S	T	E	S	E	D	T	A	D	Y	Y	C	Q	Q	90	
NYDIVK5	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I	N	S	T	E	S	E	D	T	A	D	Y	Y	C	Q	Q	90	
	100																															
NYMUVK	S	S	S	W	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K														10	
NYDIVK1	S	S	S	W	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K														10	
NYDIVK2	S	S	S	W	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K														10	
NYDIVK3	S	S	S	W	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K														10	
NYDIVK4	S	S	S	W	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K														10	
NYDIVK5	S	S	S	W	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K														10	





Антитело	Клон	Выход, мг
VH1/VK1	Нет колоний	
VH1/VK2	80H2	0,0015
VH1/VK3	48G7	0,005
VH1/VK4	Не образуется	
VH1/VK5	Не образуется	
VH1A/VK1	Нет колоний	
VH1A/VK2	Не образуется	
VH1A/VK3	Не образуется	
VH1A/VK4	Не образуется	
VH1A/VK5	Один клон	
VH2/VK1	Нет колоний	
VH2/VK2	88E6	0,17
VH2/VK3	56C9	0,0017
VH2/VK4	60A4	0,01
VH2/VK5	101H11	0,045
VH3/VK1	Не образуется	
VH3/VK2	66E11	0
VH3/VK3	42E12	0,004
VH3/VK4	15B1	0,75
VH3/VK5	104A6	0,044
VH4/VK1	Не образуется	
VH4/VK2	68D10	0,0012
VH4/VK3	38F12	0,15
VH4/VK4	7G5	0,015
VH4/VK5	108G4	0,0106
VH5/VK1	Не образуется	
VH5/VK2	75D3(72f3)	3,6, 1,5
VH5/VK3	35E6	0,35
VH5/VK4	19F4	0,13
VH5/VK5	113E2	0,225
VH6/VK1	Не образуется	
VH6/VK2	Не образуется	
VH6/VK3	31E9	0,1
VH6/VK4	23B7	0,3
VH6/VK5	Не образуется	

Не образуется: колонии отобраны, однако продукт не образуют в 24 лунках

Фиг. 10

Таблица 1: Ответная реакция 20 доноров на NYDIVH2/NYDIVK2 антитело, при изучении методом Т-клеток человека.

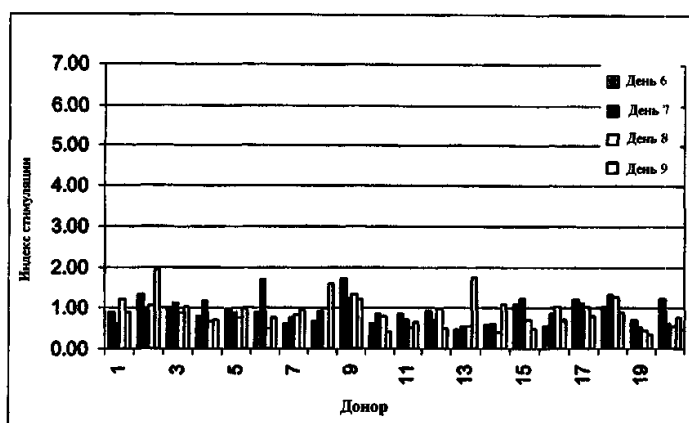
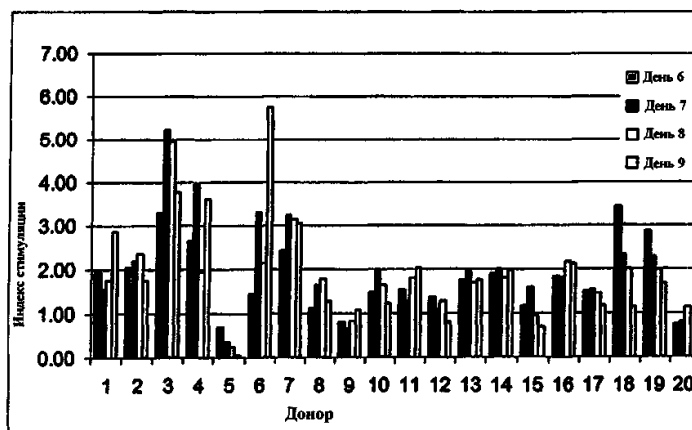


Таблица 2: Ответная реакция 20 доноров на NYR-1002 антитело крысы, при изучении методом Т-клеток человека.



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6