



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2007140257/10**, **31.03.2006**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.03.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.03.2005 JP 2005-103093
28.12.2005 JP 2005-378466(43) Дата публикации заявки: **10.05.2009** Бюл. № 13(45) Опубликовано: **10.04.2011** Бюл. № 10(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **SHAN D et al: "Synergistic effects of the
fenretinide (4-HPR) and anti-CD20 monoclonal
antibodies on apoptosis induction of malignant
human B cells", Clin Cancer Res. 2001 Aug; 7(8):
2490-5. RU 2139731 C1, 20.10.1999.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **31.10.2007**(86) Заявка РСТ:
JP 2006/306925 (31.03.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/106959 (12.10.2006)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул.Б.Спаская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364**

(72) Автор(ы):

**НУМАДЗАКИ Масанори (JP),
НАКАМУРА Тэцуо (JP),
УСУДА Садакадзу (JP),
ПАДЛАН Эдуардо А. (US)**

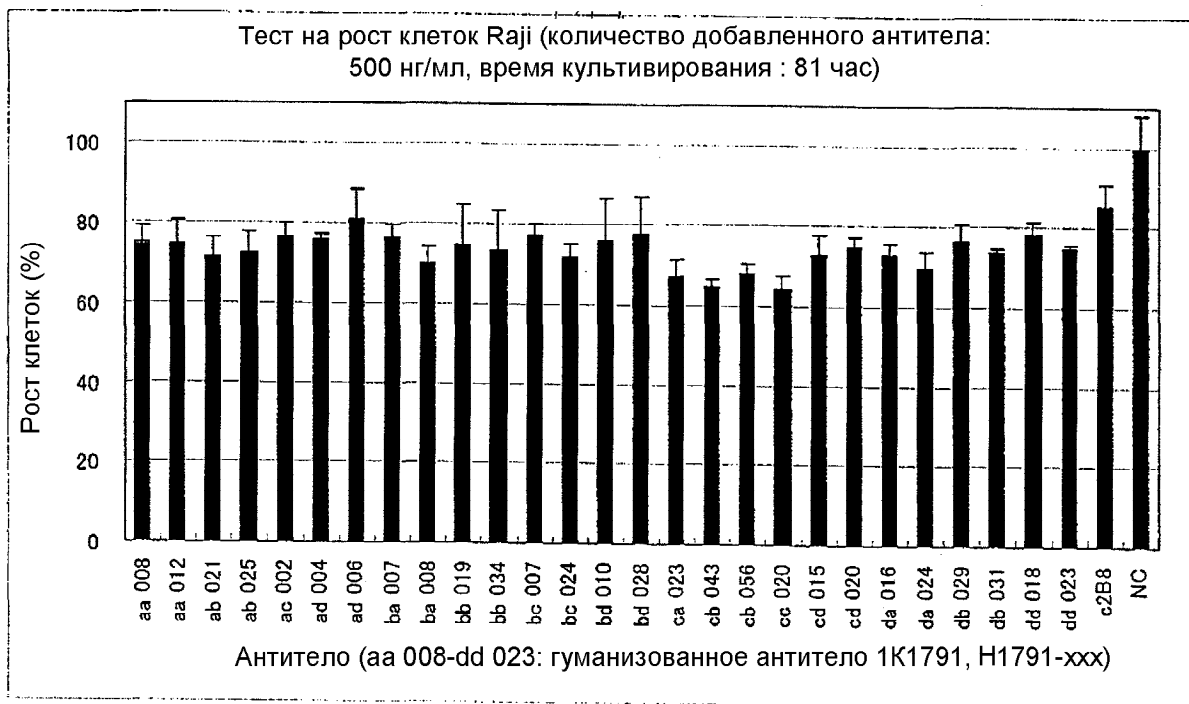
(73) Патентообладатель(и):

БАЙОМЕДИКС ИНК. (JP)**(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИ-CD20-АНТИТЕЛО**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описано моноклональное антитело, способное индуцировать специфическую биологическую реакцию посредством его связывания с антигеном CD20 на поверхности клетки. Было клонировано моноклональное антитело, обладающее высокой аффинностью связывания с внеклеточным эпитопом антигена CD20, а также биологическими

активностями, включая активность, направленную на ингибирование роста клеток. Указанное моноклональное антитело было подвергнуто химеризации или гуманизации в целях разработки терапевтического средства для лечения заболевания, опосредуемого В-клетками. Изобретение расширяет спектр терапевтических средств, полученных на основе моноклональных анти-CD20-антител. 7 н. и 3 з.п. ф-лы, 9 ил., 3 табл.



ФИГ.9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2007140257/10, 31.03.2006**(24) Effective date for property rights:
31.03.2006

Priority:

(30) Priority:
31.03.2005 JP 2005-103093
28.12.2005 JP 2005-378466(43) Application published: **10.05.2009 Bull. 13**(45) Date of publication: **10.04.2011 Bull. 10**(85) Commencement of national phase: **31.10.2007**(86) PCT application:
JP 2006/306925 (31.03.2006)(87) PCT publication:
WO 2006/106959 (12.10.2006)

Mail address:

129090, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364

(72) Inventor(s):

NUMADZAKI Masanori (JP),
NAKAMURA Tehtsuo (JP),
USUDA Sadakadzu (JP),
PADLAN Ehduardo A. (US)

(73) Proprietor(s):

BAJOMEDIKS INK. (JP)(54) **MONOCLONAL ANTI-CD20-ANTIBODY**

(57) Abstract:

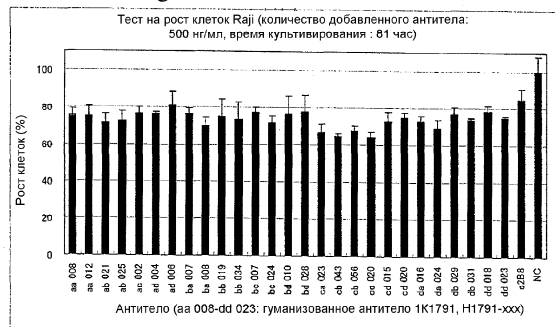
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: described is a monoclonal antibody able to induce a specific biological reaction by its binding with the antigen CD20 on a cell surface. The monoclonal antibody showing high affine binding with an extracellular epitope of the antigen CD20, as well as biological activities including that directed on cell growth inhibition has been cloned. Said monoclonal antibody has been chimerised or humanised for the purpose of creating a therapeutic agent for treating a B-cell mediated disease.

EFFECT: invention expands a spectrum of the

therapeutic agents prepared of the monoclonal anti-
CB20-antibodies.

10 cl, 9 dwg, 3 tbl, 1 ex



ФИГ.9

Область, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональному антителу против человеческого антигена CD20. Настоящее изобретение также относится к химерному моноклональному анти-CD20-антителу и к гуманизованному моноклональному анти-CD20-антителу, продуцируемому посредством рекомбинации генов, а также к терапевтическому средству для лечения В-клеточно-опосредованной опухоли или иммунологического заболевания, содержащему указанные антитела в качестве активного ингредиента.

Предшествующий уровень техники

Известными моноклональными антителами, которые распознают антиген CD20, являются антитела B1, 2B8 (химерное антитело, называемое ритуксимабом), 1F5, 2H7 и т.п. Сначала ритуксимаб, то есть химерное моноклональное анти-CD20-антитело, разработанное Фармацевтической корпорацией IDEC (Pharmaceuticals Corporation, U.S.), было создано как стандартное терапевтическое средство для лечения низкоквалифицированной не-ходжкинской лимфомы (НХЛ), но затем было обнаружено, что оно обладает терапевтическим действием против многих В-клеточно-опосредуемых иммунных заболеваний. Так, например, считается, что это средство является эффективным для лечения не только злокачественных опухолей, таких как хронический лимфолейкоз, но и для лечения аутоиммунных заболеваний, при которых продуцируются патогенные аутоантитела, таких как аутоиммунная гемолитическая анемия и идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, а также воспалительных заболеваний, таких как хронический ревматоидный артрит и рассеянный склероз (не-патентные документы 14-17).

CD20 представляет собой молекулу, присутствующую на поверхности В-лимфоцитов, и ее экспрессия наблюдается в нормальных В-клетках периферической крови, селезенки, миндалин и костного мозга и т.п., а также в В-клетках большинства злокачественных опухолей. Эта молекула насчитывает 297 аминокислотных остатков, "прошивает" клеточную мембрану четыре раза; причем С- и N-концы этой молекулы расположены внутри клетки; а ее внеклеточная область представляет собой петлю, не содержащую сахарную цепь и состоящую из 43 аминокислотных остатков, расположенных между третьим и четвертым трансмембранными доменами (не-патентные документы 1 и 9). Предполагается, что молекула CD20 существует в виде тетрамера и, кроме того, образует гетерокомплекс с другими небольшими компонентами (не-патентный документ 18). Поскольку белок CD20 не секретируется за пределы клетки и не расщепляется и, кроме того, он почти не поглощается клеткой при связывании с антителом, то можно предположить, что цитотоксический механизм, опосредуемый антителом против клеток-мишеней, является эффективным (не-патентные документы 1-3).

Молекула CD20 несмотря на свой небольшой размер имеет различные эпитопы, что частично обусловлено характером ее экспрессии как комплекса, находящегося за пределами клетки, и антитела, связывающиеся с этой молекулой, опосредуют различные биологические ответы. Так, например, активности, такие как ингибирование В-клеточных рецепторов, увеличение уровня экспрессии антигенов МНС класса II и адгезивных молекул, активация высвобождения Ca^{2+} при избыточном перекрестном связывании; ингибирование гомотипической адгезии, не зависимой от функционально связанного антигена 1 лимфоцитов; индуцирование апоптоза и противоположная активность и стимуляция клеточного роста, значительно варьируются (не-патентные документы 4-13). Типичные анти-CD20-антитела,

например ритуксимаб, B1, 1F5 и 2H7, также обладают различными свойствами и биологическими функциями, и термин “моноклональное антитело, связывающееся с CD20” не может конкретно определять его биологические свойства.

Молекула, которая составляет внеклеточный домен CD20, является нерастворимой. Хотя молекула CD20, происходящая от клеточного лизата или белка, продуцируемого рекомбинантным геном, может быть солюбилизирована с использованием поверхностно-активного вещества или сильного основания, однако сохранение природной трехмерной структуры в таких условиях обработки представляет определенные трудности. Поэтому CD20-позитивный В-клеточный штамм используется в качестве иммуногена для получения антител. Однако такой иммуноген имеет слабые иммуностимулирующие свойства, а поэтому получение клонов зрелых антителопродуцирующих клеток является нелегкой задачей.

К 2005 году ритуксимаб, то есть химерное антитело мышь/человек, было единственным моноклональным анти-CD20-антителом, разрешенным к применению в качестве терапевтического средства. Поскольку химерные антитела, содержащие гетерологичные молекулы, обладают антигенностью, то обычно они не являются предпочтительными в качестве терапевтических средств. Однако анти-CD20-антитела обладают способностью атаковать и элиминировать все В-клетки, включая нормальные клетки, а поэтому считается, что они, по существу, не обладают антигенностью. Однако были описаны примеры, в которых нейтрализующее антитело индуцируется во время его введения, хотя его уровень составляет лишь несколько процентов, и, по всей вероятности, оно индуцируется в зависимости от дозы и от периода введения дозы. Поэтому желательно получить такое гуманизованное антитело, которое имело бы последовательность, более сходную с последовательностью человеческого антитела, или последовательность человеческого антитела. Другим недостатком химерных антител является их короткое время полужизни в крови, и это время полужизни составляет всего 3 или 4 дня. Клинические исследования, проводимые в США, показали, что эффективный уровень одного ритуксимаба, вводимого для предотвращения рецидивов низкоккачественной НХЛ, составляет немного ниже 50%, что указывает на то, что у 50% или более пациентов не наблюдается ответ на ритуксимаб либо такой ответ является недостаточным. Уровень ответа у пациентов с умеренно злокачественной НХЛ еще ниже и составляет примерно лишь 30% (не-патентный документ 14). Поэтому необходимо провести исследование по выявлению факторов и причины различных ответов у пациентов и разработать антитело, обладающее более высокой эффективностью.

Не-патентный документ 1: Leukocyte Fact Book 2nd Edition, Academic Press

Не-патентный документ 2: Stashenko P et al., J. Immunol., 1980, 125: 1678-85

Не-патентный документ 3: Anderson KC et al., Blood, 1984, 63: 1424-33

Не-патентный документ 4: Shan D et al., Blood, 1998, 91: 1644-52

Не-патентный документ 5: Flieger D et al., Cell Immunol., 2000, 204: 55-63

Не-патентный документ 6: Mathas S et al., Cancer Res., 2000, 60: 7170-6

Не-патентный документ 7: Cardarelli PM et al., Cancer Immunol. Immunother., 2002, 51: 15-24

Не-патентный документ 8: Pedersen IM et al., Blood, 2002, 99: 1314-9

Не-патентный документ 9: Deans JP et al., Immunol., 2002, 107: 176-82

Не-патентный документ 10: Golay JT et al., J. Immunol., 1992, 149: 300-8

Не-патентный документ 11: Bourger I et al., Eur. J. Immunol., 1993, 23: 768-71

Не-патентный документ 12: White MW et al., J. Immunol., 1991, 146: 846-53

Не-патентный документ 13: Shan D et al., Cancer Immunol. Immunother., 2000, 48: 673-83

Не-патентный документ 14: Coiffier B et al., Blood, 1998, 92: 1927-32

Не-патентный документ 15: Edward JC et al., Rheumatology (Oxford), 2001, 40: 205-11

Не-патентный документ 16: Zaja F et al., Haematologica, 2002, 87: 189-95

5 Не-патентный документ 17: Perrotta S et al., Br. J. Haematol., 2002, 116: 465-7

Не-патентный документ 18: Polyak MJ et al., Blood, 2002, 99: 3256-62

Описание сущности изобретения

10 Целью настоящего изобретения является получение моноклонального антитела, имеющего лучшие биологические функции, чем стандартные терапевтические средства, полученные на основе моноклональных анти-CD20-антител.

Авторами настоящего изобретения с использованием двух или более CD20-антиген-
15 позитивных В-клеточных штаммов были получены мышинные моноклональные анти-CD20-антитела, которые специфически связываются с человеческим антигеном CD20, и методами биотехнологии были сконструированы клетки млекопитающих для экспрессии человеческого антигена CD20 на клеточных мембранах, а также в качестве иммуногена был получен гибрид человеческого белка CD20 с глутатион-S-трансферазой (GST) в произвольной комбинации.

20 Некоторые из этих антител обладают активностью, направленной на ингибирование клеточного роста, включая апоптоз CD20-экспрессирующей клеточной культуры *in vitro*, в отсутствие эффекторных клеток. Кроме того, независимо от присутствия или отсутствия активностей, стимулирующих ингибирование роста клеток, например апоптоз, на эффективность этих антител, включая другие отобранные мышинные
25 моноклональные анти-CD20-антитела, влияет комплемент- или антителозависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность, вызываемая химеризацией. В результате гуманизации аминокислотных последовательностей антител, которые, как было определено, обладают наиболее желательными биологическими активностями, были
30 получены моноклональные анти-CD20-антитела, которые могут быть использованы в качестве терапевтического средства. И получение таких антител было положено в основу настоящего изобретения.

В настоящем изобретении рассматриваются:

35 (1) Мышиное моноклональное анти-CD20-антитело, обладающее активностью, направленной на ингибирование роста клеток, включая апоптоз клеток, экспрессирующих человеческий антиген CD20, в культуре клеток, экспрессирующих антиген CD20 в отсутствие эффекторных клеток.

40 (2) Моноклональное анти-CD20-антитело по п.(1), где аминокислотные последовательности вариабельной области Н-цепи и вариабельной области L-цепи представляют собой последовательности SEQ ID NO: 1 и 7, SEQ ID NO: 2 и 8 или SEQ ID NO: 15 и 17.

(3) Гибридома, продуцирующая моноклональное анти-CD20-антитело по п.(1) или (2).

45 (4) Химерное моноклональное анти-CD20-антитело, где аминокислотная последовательность вариабельной области моноклонального анти-CD20-антитела по п.(2) и аминокислотная последовательность константной области человеческого иммуноглобулина присоединены друг к другу.

50 (5) Моноклональное анти-CD20-антитело, гуманизованное с использованием аминокислотной последовательности гипервариабельной области (комплементарность-определяющей области, CDR) вариабельной области моноклонального анти-CD20-антитела по п.(2) и аминокислотной последовательности

человеческого иммуноглобулина.

(6) Гуманизованное моноклональное анти-CD20-антитело по п.(5), где комбинация аминокислотных последовательностей вариабельной области Н-цепи и вариабельной области L-цепи представляет собой комбинацию последовательностей SEQ ID NO: 19 и 23, SEQ ID NO: 19 и 24, SEQ ID NO: 19 и 25, SEQ ID NO: 19 и 26, SEQ ID NO: 20 и 23, SEQ ID NO: 20 и 24, SEQ ID NO: 20 и 25, SEQ ID NO: 20 и 26, SEQ ID NO: 21 и 23, SEQ ID NO: 21 и 24, SEQ ID NO: 21 и 25, SEQ ID NO: 21 и 26, SEQ ID NO: 22 и 23, SEQ ID NO: 22 и 24, SEQ ID NO: 22 и 25 или SEQ ID NO: 22 и 26.

(7) Моноклональное анти-CD20-антитело по любому из пп.(4)-(6), которое оказывает цитотоксическое действие на клетки, экспрессирующие антиген CD20, в присутствии человеческого комплемента.

(8) Клетка млекопитающего, в которую была введена нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность моноклонального анти-CD20-антитела по любому из пп.(4)-(7).

(9) Клетка млекопитающего по п.(8), которой является клетка яичника китайского хомячка (СНО).

(10) Мышиное моноклональное анти-CD20-антитело, где комбинация аминокислотных последовательностей вариабельной области Н-цепи и вариабельной области L-цепи представляет собой комбинацию последовательностей SEQ ID NO:3 и 9, SEQ ID NO:4 и 10, SEQ ID NO:5 и 11, SEQ ID NO:6 и 12 или SEQ ID NO:16 и 18.

(11) Гибридома, продуцирующая моноклональное анти-CD20-антитело по п.(10).

(12) Химерное моноклональное анти-CD20-антитело, где аминокислотная последовательность вариабельной области моноклонального анти-CD20-антитела по п.(10) и аминокислотная последовательность константной области человеческого иммуноглобулина присоединены друг к другу.

(13) Моноклональное анти-CD20-антитело, гуманизованное с использованием аминокислотной последовательности CDR вариабельной области моноклонального анти-CD20-антитела по п.(10) и аминокислотной последовательности человеческого иммуноглобулина.

(14) Моноклональное анти-CD20-антитело по п.(12) или (13), которое оказывает цитотоксическое действие на клетки, экспрессирующие антиген CD20, в присутствии человеческого комплемента.

(15) Клетка млекопитающего, в которую была введена нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность моноклонального анти-CD20-антитела по любому из пп.(12)-(14).

(16) Клетка млекопитающего по п.(15), которой является клетка СНО.

(17) Диагностическое средство, содержащее моноклональное анти-CD20-антитело по любому из пп.(2), (4)-(7), (10) и (12)-(14) в качестве активного ингредиента.

(18) Терапевтическое средство, содержащее моноклональное анти-CD20-антитело по любому из пп.(4)-(7) и (12)-(14) в качестве активного ингредиента.

Аминокислотные остатки в аминокислотных последовательностях моноклональных антител, определенных выше, могут быть заменены другими аминокислотными остатками при условии, что такие замены не будут оказывать значительного влияния на вторичные структуры и биологические свойства указанных антител, и такие моноклональные антитела, имеющие модифицированные аминокислотные последовательности, упомянутые выше, также входят в объем настоящего изобретения.

Краткое описание графического материала

Фиг.1. Структура вектора, экспрессирующего рекомбинантное антитело, pNOW-Ab.

Фиг.2. Структура вектора, экспрессирующего белок, pNOW-Ag.

Фиг.3. Последовательности праймеров для клонирования человеческого гена CD20.

Фиг.4. Аминокислотные последовательности вариабельных областей Н-цепи и L-цепи мышиных моноклональных анти-CD20-антител.

Фиг.5. Результаты теста на апоптоз, проводимого с использованием мышиных моноклональных анти-CD20-антител.

Фиг.6. Результаты теста на ингибирование роста клеток, проводимого с использованием мышиных моноклональных анти-CD20-антител.

Фиг.7. Результаты теста на комплементзависимую цитотоксичность, проводимого с использованием химерных моноклональных анти-CD20-антител.

Фиг.8А. Аминокислотные последовательности вариабельных областей Н-цепи и L-цепи гуманизованных моноклональных анти-CD20-антител и нуклеотидные последовательности, соответствующие этим последовательностям.

Фиг.8В. Аминокислотные последовательности вариабельных областей Н-цепи и L-цепи гуманизованных моноклональных анти-CD20-антител и нуклеотидные последовательности, соответствующие этим последовательностям.

Фиг.9. Результаты теста на ингибирование роста клеток, проводимого с использованием гуманизованных моноклональных анти-CD20-антител.

Наилучшие варианты осуществления изобретения

Используемый в настоящем изобретении термин “антитело” означает антитело в его общепринятом значении, а также составляющие его Н- и L-цепи и их фрагменты.

Настоящее изобретение относится к моноклональному анти-CD20-антителу, которое связывается с человеческим антигеном CD20 на клеточной мембране и обладает желательными биологическими активностями, способствующими индуцированию терапевтического эффекта.

Антителом согласно первому варианту настоящего изобретения является моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим антигеном CD20 на клеточной мембране и обладает активностями, направленными на ингибирование роста клеток, включая апоптоз клеток, экспрессирующих человеческий антиген CD20 в культуре клеток, экспрессирующих антиген CD20, в отсутствие эффекторных клеток. Таким антителом является, главным образом, мышиное моноклональное анти-CD20-антитело, а также моноклональное анти-CD20-антитело, полученное путем его химеризации или гуманизации. Такие антитела непосредственно обладают активностями, направленными на ингибирование роста клеток, включая апоптоз клеток, экспрессирующих человеческий антиген CD20 в *in vitro* культуре клеток, экспрессирующих антиген CD20, в отсутствие эффекторных клеток. Такие химерные или гуманизованные моноклональные анти-CD20-антитела обладают комплемент- и/или антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью.

Уровень связывания с антигеном CD20 на клеточной мембране может быть оценен с помощью ELISA-анализа клеток, в котором CD20-экспрессирующие клетки, такие как клетки SB и Raji, подвергают адгезии к планшету, а затем взаимодействию с тестируемым моноклональным антителом. Однако, поскольку уровни экспрессии антигена CD20 этими клетками являются недостаточными, то и их реактивность является невысокой. Поэтому в настоящем изобретении был разработан способ осуществления клеточного ELISA, в котором клетки CHO, экспрессирующие большое количество CD20 в результате рекомбинации генов (CD20/CHO-клетки), подвергают адгезии к планшету, а затем взаимодействию с тестируемым моноклональным

антителом. В предварительном тесте, проводимом в соответствии с настоящим изобретением, было подтверждено, что клеточный ELISA-анализ, осуществляемый с использованием CD20/СНО-клеток, обнаруживает такую же картину, как и клеточный ELISA-анализ, осуществляемый с использованием клеток SB или Raji в тесте на реактивность моноклонального антитела, и обладает высокой специфичностью (см., например, проведение скрининга с помощью клеточного ELISA для CD20/СНО-клеток, таблица 1).

Активности, направленные на прямое ингибирование роста клеток в *in vitro* культуре клеток, экспрессирующих человеческий антиген CD20, в отсутствие эффекторных клеток, могут быть определены обычным методом (Miyamoto T et al., Avian Dis., Vol. 46(1), 10-16). Кроме того, способность индуцировать апоптоз может быть определена в тесте с применением проточной цитометрии (путем окрашивания аннексином V/йодидом пропидия (PI)).

Примерами антител согласно первому варианту изобретения являются мышинные моноклональные анти-CD20-антитела, имеющие комбинацию аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:1 и 7, SEQ ID NO:2 и 8 или SEQ ID NO:15 и 17 в вариабельной области Н-цепи и в вариабельной области L-цепи, а также моноклональные анти-CD20-антитела, полученные путем химеризации или гуманизации этих антител. Такие антитела обладают активностью, направленной на прямое ингибирование роста клеток, включая апоптоз клеток, экспрессирующих человеческий антиген CD20 в *in vitro* культуре клеток, экспрессирующих антиген CD20, в отсутствие эффекторных клеток. Эти антитела также обладают комплемент- и/или антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью. Кроме того, настоящее изобретение включает гибридому, продуцирующую мышинное антитело, а также клетки млекопитающих (клетки СНО в примерах), в которые была введена нуклеотидная последовательность, соответствующая любой одной из аминокислотных последовательностей химерных или гуманизованных антител.

Химеризацию осуществляют путем присоединения аминокислотной последовательности вариабельной области Н-цепи мышинного моноклонального антитела к аминокислотной последовательности константной области Н-цепи человеческого иммуноглобулина и аминокислотной последовательности вариабельной области L-цепи к аминокислотной последовательности константной области L-цепи человеческого иммуноглобулина (Ishida T et al., Nippon Rinsho, Vol. 60, №3, 439-444). Гуманизованные антитела конструируют с использованием аминокислотной последовательности CDR вариабельной области мышинного моноклонального антитела и аминокислотной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизованные моноклональные анти-CD20-антитела, которые являются предпочтительными для их использования в качестве терапевтических средств, отбирают путем сравнения свойств различных сконструированных антител (Padlan EA, Mol. Immunol., Vol. 28, №4/5, 489-498; Wu TT and Kabat EA, Mol. Immunol., Vol. 29, №9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J., Vol. 9, 133-139).

Химерные или гуманизованные моноклональные анти-CD20-антитела также обладают комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) и антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью (ADCC) в присутствии эффекторных клеток. Анализы на CDC и ADCC могут быть проведены общеизвестными методами (Manches O et al., Blood, 2003, 101(3), 949-54; Idusogie EE et al., J. Immunol., 2000, 164, 4178-4184).

Конкретными примерами гуманизованных моноклональных анти-CD20-антител

являются антитела, имеющие комбинацию аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19 и 23, SEQ ID NO: 19 и 24, SEQ ID NO: 19 и 25, SEQ ID NO: 19 и 26, SEQ ID NO: 20 и 23, SEQ ID NO: 20 и 24, SEQ ID NO: 20 и 25, SEQ ID NO: 20 и 26, SEQ ID NO: 21 и 23, SEQ ID NO: 21 и 24, SEQ ID NO: 21 и 25, SEQ ID NO: 21 и 26, SEQ ID NO: 22 и 23, SEQ ID NO: 22 и 24, SEQ ID NO: 22 и 25 или SEQ ID NO: 22 и 26 в варибельной области Н-цепи и в варибельной области L-цепи.

Антителом согласно второму варианту изобретения является мышинное моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим антигеном CD20 на клеточной мембране и не обладает активностью, направленной на ингибирование роста клеток, включая апоптоз, либо оно обладает невысокой активностью. Однако на CDC- или ADCC-активность этих мышинных антител может повлиять их химеризация или гуманизация. Указанные цитотоксические активности также являются очень важными биологическими активностями, а поэтому моноклональное анти-CD20-антитело согласно второму варианту изобретения может также рассматриваться как кандидат на его использование в качестве терапевтического средства.

Примерами антител согласно второму варианту изобретения являются мышинные моноклональные анти-CD20-антитела, имеющие комбинацию аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:3 и 9, SEQ ID NO:4 и 10, SEQ ID NO:5 и 11, SEQ ID NO: 6 и 12 или SEQ ID NO:16 и 18 варибельной области Н-цепи и варибельной области L-цепи, а также моноклональные анти-CD20-антитела, полученные путем химеризации или гуманизации этих антител. Настоящее изобретение также включает гибридому, продуцирующую указанное мышинное антитело, и клетки млекопитающих (клетки CHO в примере), в которые была введена нуклеотидная последовательность, соответствующая любой одной из указанных аминокислотных последовательностей химерных или гуманизованных антител.

Метод определения уровня связывания с антигеном CD20 на клеточной мембране, различные методы анализа на ингибирование роста клеток, апоптоз, ADCC, CDC и т.п. и метод получения химерных или гуманизованных антител аналогичны соответствующим методам, описанным для антитела согласно первому варианту изобретения.

При этом предполагается, что химерное моноклональное анти-CD20-антитело и гуманизованное моноклональное анти-CD20-антитело, рассматриваемое в первом и втором вариантах изобретения, обладают большей эффективностью как терапевтические средства для лечения опосредуемых В-клетками злокачественных опухолей и иммунных заболеваний, в патогенезе которых участвуют В-клетки, а поэтому целью настоящего изобретения является использование этих антител для разработки терапевтического средства, содержащего в качестве активного ингредиента химерное или гуманизованное моноклональное анти-CD20-антитело, а предпочтительно гуманизованное моноклональное анти-CD20-антитело. Примерами рассматриваемых заболеваний являются не-ходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, хронический лимфолейкоз, острый лимфолейкоз, хронический ревматоидный артрит, аутоиммунная гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, системная красная волчанка, синдром, ассоциированный с вырабатыванием антител против фосфолипида, синдром Сьегрена, болезнь Крона, склеродермия, рассеянный склероз, диабет типа 1 и т.п.

Мышиное моноклональное антитело согласно изобретению может быть получено описанным ниже методом.

В качестве иммуногена для сенсibilизации могут быть использованы комбинации клеток SB или Raji, которые представляют собой клеточные штаммы, экспрессирующие человеческий антиген CD20, и клеток CHO, экспрессирующих человеческий антиген CD20. Кроме того, в качестве вспомогательного

5 сенсibilизирующего антигена может быть использован человеческий белок CD20, конъюгированный с GST (GST-CD20).

Моноклональное антитело, продуцируемое гибридомой, может быть получено рядом способов, включая (1) иммунизацию животного, предназначенного для

10 иммунизации (мыши), (2) получение лимфоцитов от указанного иммунизированного животного, (3) получение родительских клеток, (4) слияние лимфоцитов и родительских клеток, (5) скрининг и (6) клонирование (Biochemistry Experiment Method: Monoclonal antibody, written by Ailsa M. Campbell, translated by Toshiaki Osawa, Tokyo Kagaku Dozin Co., Ltd., 1989). Моноклональное анти-CD20-антитело, которое

15 специфически связывается с антигеном CD20 на клеточной поверхности, может быть клонировано посредством реакции тестируемого моноклонального антитела с клеточной ELISA-системой, где клетки CD20/CHO иммобилизованы на планшете. Могут быть также использованы коммерчески доступные экспрессионные векторы.

20 Однако, поскольку необходимо, чтобы антиген CD20 экспрессировался на клетках CHO с высокой плотностью, то может быть использован высокоэкспрессионный вектор млекопитающих, pNOW (Japanese Patent №3582965). Критерием отбора моноклонального антитела может служить его реактивность, сравнимая или

25 превышающая реактивность позитивного контроля.

Химерное или гуманизованное антитело может быть получено в соответствии со стандартной методикой рекомбинации генов. Так, например, для продуцирования антитела в качестве экспрессионного вектора может быть использован вектор pNOW-Ab, который содержит 2 набора сайтов множественного клонирования,

30 расположенных тандемно и предварительно введенных вместе с генами, кодирующими константные области человеческой H-цепи и L-цепи (фиг.1).

Пример 1

Получение, химеризация и гуманизация моноклональных антител против антигена CD20, а также тест для определения свойств полученных антител будут

35 описаны ниже со ссылками на примеры.

(1) Получение иммуногена для сенсibilизации мышей

Ген, кодирующий человеческий CD20, получали из библиотеки кДНК с использованием 5'-праймера SEQ ID NO:13 и 3'-праймера SEQ ID NO: 14, которые

40 являются специфичными в отношении гена, кодирующего полноразмерную молекулу человеческого CD20 (Multiple Choice cDNA human spleen, Origene Technologies, Inc., 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, MD 20850). В частности, были использованы праймеры, представленные на фиг.3. Ген CD20 вводили в вектор pNOW-Ag (фиг.2), используемый в качестве высокоэкспрессионного вектора для экспрессии в клетках млекопитающих,

45 и трансфицировали в клетки CHO, используемые в качестве клеток-хозяев. Рекомбинантные клетки CHO (клетки CD20/CHO), экспрессирующие на своей поверхности молекулы CD20 на высоком уровне, были протестированы с помощью FACS-анализа. Клетки, которые при их окрашивании ФИТЦ-мечеными моноклональными анти-CD20-антителами обнаруживали 5-кратное или большее

50 превышение интенсивности флуоресценции по сравнению с клетками SB, были определены как клетки, имеющие высокий уровень экспрессии. GST-CD20, дополнительный иммуноген, получали путем присоединения GST у N-конца

внеклеточного домена CD20, состоящего из 43 аминокислотных остатков, с использованием вектора pGEX-4T2 (G et al. AM, Electrophoresis, Vol. 20(2): 344-348).

(2) Получение иммуногена

Клетки SB или Raji культивировали в среде RPMI 1640, в которую была добавлена 10% FCS. Клетки CD20/CHO культивировали в среде CHO-S-SFM II (GIBCO, Cat. №12052-098), в которую было добавлено 800 мкг/мл G418. Эти культуры центрифугировали (1100 об/мин, 5 минут), а затем в клеточные культуры добавляли среду Дульбекко без PBS (PBS(-)) и суспендировали, после чего суспензию снова центрифугировали. Эту процедуру промывки повторяли еще раз и суспензию, полученную путем добавления к клеткам (количество клеток: $1-3 \times 10^7$ /мл) физиологического раствора, использовали для иммунизации. Вектор pGEX-4T2, в который был включен GST-CD20, вводили в компетентные клетки *E. coli*. После культивирования компетентные клетки подвергали лизису и GST-CD20 посредством грубой очистки отделяли от лизированных клеток, а затем солибилизовали путем добавления 0,1 н. гидроксида натрия.

(3) Иммунизация и слияние клеток

Для иммунизации использовали самок 7-11-недельных мышей Balb/c. Клетки SB, клетки Raji или клетки CD20/CHO повторно вводили два или три раза через различные интервалы времени в несколько дней, а затем клетки отбирали на различные клеточные антигены (клетки SB, клетки Raji или клетки CD20/CHO) и использовали для конечной иммунизации. Число вводимых клеток независимо от их типа составляло $1-3 \times 10^7$ на мышь. Затем для части мышей проводили дополнительную иммунизацию с использованием GST-CD20. Через три дня после конечной иммунизации у мышей брали клетки селезенки и суспендировали в среде RPMI, а затем осуществляли слияние этих клеток с мышинными миеломными клетками (NS-1) в присутствии ПЭГ-1500 (Oi, VT et. Herzenberg, 1980, in: Selected Methods in Cellular Immunology; Mishell B et al. (Freeman and Co., San Francisco, CA) p.351).

(4) Разработка метода ELISA-скрининга клеток CD20/CHO

Несколько мышинных моноклональных анти-CD20-антител и антител 2B8 подвергали взаимодействию с клетками SB, с клетками Raji, с клетками CD20/CHO и с родительскими CD20-клетками CHO, которые были иммобилизованы на 96-луночных планшетах. Было подтверждено, что в этих клеточных ELISA-тестах наблюдались аналогичные тенденции для концентраций антител, и было обнаружено, что могут быть также проведены относительные сравнения этих антител между собой и с контролем. Из-за высокой плотности антигенов клеточной поверхности, иммобилизованных на планшете, в ELISA-анализе клеток CD20/CHO, наблюдаемый уровень оптической плотности был достаточным для детекции даже в образце с относительно низкой концентрацией тестируемого антитела, в результате чего было установлено, что указанный анализ представляет собой чувствительную систему измерения. Конкретные результаты измерения приводятся в таблице 1.

Таблица 1

Сравнение клеток SB, клеток Raji и клеток CD20/CHO в ELISA

Антитело	ELISA клеток Raji (A492)						ELISA клеток SB (A492)					
	концентрация антитела (нг/мл)						концентрация антитела (нг/мл)					
	1000	320	100	32	10	3	1000	320	100	32	10	3
1K1228	1,683	1,170	0,678	0,326	0,148	nt	1,265	0,931	0,452	0,192	0,082	Nt
1K1257	1,775	1,263	0,782	0,445	0,177	0,096	1,509	1,143	0,570	0,276	0,119	0,055
1K1402	1,228	0,525	0,214	0,102	0,061	0,049	0,763	0,400	0,152	0,095	0,066	0,057
1K1422	0,748	0,277	0,121	0,057	0,046	0,049	0,403	0,147	0,071	0,039	0,036	0,051

	1K1428	1,196	0,514	0,222	0,104	0,067	0,057	1,111	0,509	0,252	0,108	0,058	0,061
	1K1436A	0,887	0,376	0,191	0,105	0,058	0,058	0,959	0,445	0,264	0,120	0,067	0,065
	2B8	0,329	0,121	0,055	0,038	0,034	0,046	0,337	0,091	0,045	0,038	0,037	0,053
	NC	0,035						0,028					
5		ELISA клеток CD20/CHO (A492)						ELISA клеток CHO (родительской клеточной линии) (A492)					
	Антитело	концентрация антитела (нг/мл)						концентрация антитела (нг/мл)					
		1000	320	100	32	10	3	1000	320	100	32	10	3
	1K1228	3,056	2,704	2,091	1,275	0,572	0,265	0,081	0,040	0,038	0,034	0,038	Nt
10	1K1257	3,184	2,576	1,924	1,223	0,604	0,271	0,095	0,053	0,038	0,039	0,037	0,029
	1K1402	1,877	1,574	1,486	0,824	0,389	0,174	0,385	0,170	0,085	0,063	0,070	0,065
	1K1422	2,230	1,327	0,842	0,238	0,105	0,068	0,164	0,068	0,046	0,047	0,035	0,067
	1K1428	2,544	2,448	2,190	0,967	0,463	0,283	0,564	0,213	0,091	0,056	0,050	0,060
	1K1436A	2,432	2,369	2,278	1,101	0,559	0,286	0,375	0,153	0,072	0,043	0,043	0,060
	2B8	2,293	1,664	1,090	0,561	0,174	0,089	0,056	0,040	0,045	0,035	0,044	0,060
15	NC	0,070						0,029					

(5) Скрининг с помощью клеточного ELISA

Клеточный ELISA осуществляли с использованием 96-луночного планшета, на котором были иммобилизованы клетки CD20/CHO или клетки CHO (родительская клеточная линия CD20), и отбирали лунки, в которых продуцировались антитела, специфически реагирующие с CD20. В качестве позитивного контроля использовали 2B8, а в качестве негативного контроля использовали мышинное моноклональное антитело против человеческого антигена CD3 (BD PharMingen). В частности, для проведения клеточного ELISA использовали клетки CD20/CHO или клетки CHO (родительскую клеточную линию), иммобилизованные на 96-луночном планшете, покрытом поли-L-лизинном (Asahi Techno Glass Corporation, Cat. № 11-023-018). В каждую лунку добавляли блокирующий раствор (0,2% желатина и 0,5% раствора BSA в PBS) в объеме 150 мкл и оставляли на 1 час при 37°C. Затем планшет 5 раз промывали 150 mM NaCl и 0,05% водного раствора твина 20, после чего в каждую лунку добавляли 100 мкл каждого из образцов (разведенного раствора супернатанта культуры) и проводили первичную реакцию при 37°C в течение 1 часа. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл разведенного раствора меченого антитела [ПХ-меченного кроличьего антитела против мышинных IgG(H+L) (Jackson Lab., Code № 315-035-003) или ПХ-меченного кроличьего антитела против мышинных IgG(Fcγ) (Jackson Lab., Code № 315-035-008)] и проводили вторичную реакцию при 37°C в течение 1 часа. В целях получения реакционных смесей для первичной и вторичной реакции тот же самый раствор использовали в качестве блокирующего раствора. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора для проявления окраски (OPD), а через 30 минут добавляли 50 мкл 4 н. H₂SO₄ для прекращения реакции и измеряли оптическую плотность при 492 нм (A492). Затем отбирали лунки, обнаруживающие реактивность, сравнимую с реактивностью антитела 2B8 или значительно превышающую эту реактивность.

(6) Клонирование

Клонирование осуществляли методом лимитирующего разведения. Клетки высевали на 96-луночный планшет и культивировали, а затем для отбора клона, продуцирующего специфическое антитело, проводили клеточный ELISA для клеток CD20/CHO с использованием супернатанта культуры в лунке, содержащей 1 колонию.

(7) Получение очищенного антитела

Клон, продуцирующий специфическое антитело, культивировали в среде RPMI 1640,

в которую была добавлена 10% FCS. При достижении клеточной плотности примерно 5×10^5 /мл эту среду заменяли бессывороточной средой ASF-104N (Ajinomoto Co. Inc.) и продолжали культивирование. Затем через 2-4 дня культуральную среду центрифугировали и супернатант культуры собирали, а затем очищали на колонке с G-белком. Раствор элюированного моноклонального антитела диализовали против 150 мМ NaCl. Раствор стерилизовали фильтрацией с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм и использовали в качестве тестируемого антитела (мышинного моноклонального антитела против человеческого CD20).

Клоны моноклональных антител, обнаруживающие аффинность связывания, сравнимую с аффинностью связывания позитивного контроля, отбирали с помощью ELISA клеток CD20/CHO. Затем определяли генные последовательности переменных областей этих антител, а следовательно, и их аминокислотные последовательности. Последовательности переменной области Н-цепи и переменной области L-цепи типичных антител представлены в SEQ ID NO: 1 и 7, SEQ ID NO: 2 и 8, SEQ ID NO: 3 и 9, SEQ ID NO: 4 и 10, SEQ ID NO: 5 и 11, SEQ ID NO: 6 и 12, SEQ ID NO: 15 и 17 и SEQ ID NO: 16 и 18 (фиг.4). Кроме того, были исследованы биологические свойства этих клонов.

Тест на биологические свойства (1): Тест на индуцирование апоптоза

Способность тестируемых антител индуцировать апоптоз определяли с помощью проточной цитометрии (путем окрашивания аннексином V/PI). В качестве позитивного контроля использовали 2B8, а в качестве негативного контроля использовали мышинное моноклональное антитело против человеческого CD3 (BD PharMingen). Для этого проводили нижеследующие процедуры.

Был использован набор для апоптоза МЕВЦУТО (MBL, Cat. № 4700, Lot. 20).

Клетки Raji центрифугировали, а затем суспендировали в свежей среде RPMI 1640 (Sigma, Cat. № R8758, Lot 44K2416), содержащей 10% FCS (инактивированную) (ICN, Cat. № 2916754, Lot 8005C), и в каждую лунку 12-луночного планшета добавляли 1 мл полученной суспензии при плотности 5×10^5 клеток/мл. Для каждого антитела использовали двенадцать лунок и каждое антитело добавляли при конечной концентрации 2 мкг/мл или 4 мкг/мл (3 лунки $\times$ 2 различных концентрации $\times$ 2 раза, всего 12 лунок).

Через один день и через два дня после начала культивирования культуральную среду, содержащую примерно 2×10^5 клеток, собирали и центрифугировали, а затем клетки один раз промывали PBS. После этого в клетки добавляли 85 мкл связывающего буфера и клетки суспендировали в этом буфере. Затем к полученной суспензии добавляли 10 мкл аннексина V-ФИТЦ и 5 мкл PI, смешивали в достаточной степени и оставляли на 15 минут в светонепроницаемом помещении при комнатной температуре для прохождения реакции. Измерение проводили с помощью проточной цитометрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) и результаты анализировали на аппарате CellQuest (Becton Dickinson).

Результаты измерений для 8 видов типичных мышинных моноклональных анти-CD20-антител, позитивного контроля (2B8) и негативного контроля (анти-CD3 антитела) представлены на фиг.5. Вообще говоря, можно утверждать, что апоптоз-индуцирующая активность антитела 2B8 является высокой. Но даже по сравнению с этим антителом, клон, имеющий аминокислотные последовательности переменной области Н-цепи и переменной области L-цепи, представленные SEQ ID NO: 2 и 8 (1K1791), обладал значительно более высокой апоптоз-индуцирующей активностью. Гибель клеток, явно обусловленная апоптозом, также наблюдалась для клонов,

которые имели аминокислотные последовательности вариабельной области Н-цепи и вариабельной области L-цепи, представленные SEQ ID NO: 1 и 7 (1K1422) и SEQ ID NO: 15 и 17 (1K0924).

Тест на биологические свойства (2): Тест на ингибирование роста клеток

Суспензию 5×10^4 клеток Raji/мл получали с использованием среды RPMI 1640, в которую была добавлена 10% FCS, а затем эту суспензию добавляли в 96-луночный планшет в объеме 100 мкл/лунку и проводили культивирование. Через 24 часа добавляли 50 мкл/лунку каждого раствора антитела при концентрации антител 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл или 1 мкг/мл и продолжали культивирование. Через 72 часа после добавления антитела добавляли 10 мкл/лунку раствора для проявления окраски (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, Cat. № 343-07623, Lot SG076), клетки культивировали еще 4 часа, а затем измеряли оптическую плотность при 492 нм. Число живых клеток, продуцирующих 8 видов типичных мышинных моноклональных анти-CD20-антител и позитивный контроль (2B8), указано на фиг.6 и выражено в процентах от негативного контроля (100%). Действие, направленное на ингибирование роста клеток, может быть оценено исходя из уровня снижения числа живых клеток по сравнению с негативным контролем. Явное ингибирование роста клеток наблюдалось для 1K0924, 1K1422, 1K1791 и 2B8, используемых в качестве позитивного контроля, а особенно заметным было ингибирование под действием 1K1791. Эта тенденция прослеживалась и в результатах теста на индуцирование апоптоза.

Получение химерных антител

Гены, кодирующие вариабельные области Н-цепи и L-цепи каждого мышинного антитела, встраивали в вектор pNOW-Ab, то есть высокоэкспрессионный вектор для клеток CHO, уже содержащий гены, кодирующие константные области (к) Н-цепи и L-цепи человеческого иммуноглобулина, в виде кластера. Каждый экспрессионный вектор трансфицировали в клетки CHO и для каждого антитела отбирали клоны, обнаруживающие высокую продуктивность.

Тест на способность химерных антител связываться с антигеном CD20

Полученные 8 видов химерных моноклональных анти-CD20-антител были проанализированы на их способность реагировать с человеческим антигеном CD20 с помощью ELISA-клеток CD20/CHO. В качестве позитивного контроля использовали ритуксимаб (с2B8). Результаты теста представлены в таблице 2. Величины, измеренные в клеточном ELISA (A492), представляют собой уровень связывающей активности. Эти антитела обнаруживали аффинность связывания, по существу, сравнимую с аффинностью или превышающую аффинность связывания контрольных антител, за исключением с1K0924 и с1K1422, которые обнаруживали несколько более низкую аффинность по сравнению с контролем.

Таблица 2

ELISA-анализ для клеток CD20/CHO, продуцирующих химерные анти-CD20-антитела

Антитело	ELISA клеток CD20/CHO (A492)					
	Концентрация антитела (нг/мл)					
	100	32	10	3	1	0
c1K0924	1,423	0,724	0,391	0,186	0,094	0,032
c1K1228	2,226	1,580	0,701	0,289	0,120	0,032
c1K1402	2,449	1,621	0,737	0,349	0,116	0,032
c1K1422	1,919	0,912	0,357	0,151	0,077	
c1K1712	2,292	1,683	0,793	0,359	0,145	
c1K1736	2,428	1,548	0,748	0,320	0,122	

c1K1782	2,101	1,017	0,505	0,169	0,074
c1K1791	2,231	1,458	0,745	0,276	0,108
c2B8	2,147	1,143	0,536	0,226	0,088

5 Тест на CDC химерных антител

Полученные 8 видов химерных моноклональных анти-CD20-антител оценивали на их CDC-активность. В качестве позитивного контроля использовали ритуксимаб (c2B8). В качестве клеток-мишеней использовали клетки RC-K8 (полученные от Kochi Medical School). Для проведения этого теста приготавливали и использовали среду RHB (базальная среда: RPMI-1640 с добавками: 0,1% BSA, 20 мМ HEPES (pH 7,2), 2 мМ глутамин, 100 единиц/мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина). Клетки-мишени промывали средой RHB и ресуспендировали при 10^6 клеток/мл. В каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета для культивирования тканей (черный) добавляли 50 мкл каждого из растворов тестируемых химерных антител и ритуксимаба в различных концентрациях, 50 мкл 4-кратно разведенного раствора коммерчески доступного человеческого комплемента (Quidel, San Diego, CA, Cat. A113) и 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 10^6 клеток/мл. Концентрация антитела в смеси 150 мкл/лунку составляла 0,1, 1 и 10 мкг/мл. Для стимуляции опосредуемого комплементом лизиса клеток смесь инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 2 часов. К этой смеси добавляли 50 мкл аламарового синего (неразведенного, изготовленного фирмой AccuMed International, Biosource, Cat. DAL1100) и смесь оставляли на ночь при тех же условиях для прохождения реакции. Затем планшет оставляли на 10 минут при комнатной температуре для охлаждения и измеряли интенсивность флуоресценции при излучении на 590 нм и при возбуждении на 530 нм с использованием флуоресцентного ридера для микротитрационных планшетов. Полученные результаты были представлены как интенсивность флуоресценции (RFU). Уровень CDC-активности вычисляли по следующему уравнению:

$$\% \text{ CDC-активности} = 100 \times \frac{\text{RFU (без добавления антитела)} - \text{RFU (с добавлением антитела)}}{\text{RFU (без добавления антитела)} - \text{RFU (с добавлением тритона X-100)}}$$

Результаты представлены на фиг.7. Все антитела, за исключением c1K1712, обладали CDC-активностями, которые были, по существу, сравнимы с активностью C2B2, используемого в качестве позитивного контроля, или превышали такую активность.

Получение гуманизованных антител

Гуманизованные антитела конструировали на основе CDR варибельной области мышиного моноклонального анти-CD20-антитела 1K1791. Путем проведения структурного анализа исходя из аминокислотных последовательностей и путем дополнительной модификации такого метода конструирования было получено 4 вида гуманизованных последовательностей для каждой из H-цепей и L- цепей (Padlan EA, Mol. Immunol., Vol. 28, № 4/5, 489-498; Wu TT and Kabat EA, Mol. Immunol., Vol. 29, № 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J., Vol. 9, 133-139). Были получены антитела со всеми возможными комбинациями четырех типов для каждой из H- и L-цепей. Эти аминокислотные последовательности представлены в SEQ ID NO: 19 и 23, SEQ ID NO: 19 и 24, SEQ ID NO: 19 и 25, SEQ ID NO: 19 и 26, SEQ ID NO: 20 и 23, SEQ ID NO: 20 и 24, SEQ ID NO: 20 и 25, SEQ ID NO: 20 и 26, SEQ ID NO: 21 и 23, SEQ ID NO: 21 и 24, SEQ ID NO: 21 и 25, SEQ ID NO: 21 и 26, SEQ ID NO: 22 и 23, SEQ ID NO: 22 и 24, SEQ ID NO: 22 и 25 и SEQ ID NO: 22 и 26 (фиг.8А и 8В).

Аминокислотные последовательности 4 видов варибельных областей H-цепи и 4

видов переменных областей L-цепи были преобразованы в последовательности ДНК (нуклеотидные последовательности) с кодонами, наиболее часто встречающихся в человеческих генных последовательностях, и некоторые из этих нуклеотидов были изменены с учетом возможности их использования в клетках-хозяевах CHO без изменения исходных аминокислотных остатков (Kim CH et al., Gene, 1997, 15; 199 (1-2): 293-301). В частности, нуклеотидными последовательностями, соответствующими аминокислотным последовательностям, являются последовательность SEQ ID NO: 27, соответствующая SEQ ID NO: 19; последовательность SEQ ID NO: 28, соответствующая SEQ ID NO: 20; последовательность SEQ ID NO: 29, соответствующая SEQ ID NO: 21; последовательность SEQ ID NO: 30, соответствующая SEQ ID NO: 22; последовательность SEQ ID NO: 31, соответствующая SEQ ID NO: 23; последовательность SEQ ID NO: 32, соответствующая SEQ ID NO: 24; последовательность SEQ ID NO: 33, соответствующая SEQ ID NO: 25; и последовательность SEQ ID NO: 34, соответствующая SEQ ID NO: 26 (фиг.8А и 8В). В этих нуклеотидных последовательностях нуклеотиды могут быть заменены другими нуклеотидами при условии, что соответствующие аминокислотные последовательности останутся без изменения.

Было синтезировано всего 8 видов нуклеотидных последовательностей переменных областей H-цепи (SEQ ID NO: 27-30) и переменных областей L-цепи (SEQ ID NO: 31-34) (Takara Shuzo Co., Ltd.), и эти последовательности встраивали в pNOW-Ab, то есть в экспрессионный вектор для клеток млекопитающих, содержащий сайт множественного клонирования. Экспрессионные векторы, в которые были включены каждый из этих генов гуманизированных антител, трансфицировали в клетки CHO и для каждого антитела отбирали клоны с высокой продуктивностью.

Тесты на биологические свойства гуманизированных антител и на ингибирование ими клеточного роста

Суспензию, содержащую 5×10^4 клеток Raji/мл, получали с использованием среды RPMI 1640, в которую была добавлена 10% FCS, а затем эту суспензию добавляли в 96-луночный планшет в объеме 100 мкл/лунку и проводили культивирование. Через 24 часа добавляли 50 мкл/лунку каждого раствора антитела при концентрации антитела 0,5 мкг/мл и продолжали культивирование. Через 72 часа после добавления антитела добавляли 10 мкл/лунку раствора для проявления окраски (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, Cat. № 343-07623, Lot SG076) и клетки культивировали еще 4 часа, а затем измеряли оптическую плотность при 492 нм. Число живых клеток, продуцирующих 15 (27 клонов) из 16 видов гуманизированных антител, происходящих от 1K1791 и C2B8 (другое название ритуксимаба), и используемых в качестве позитивного контроля, указано на фиг.9 и выражено в процентах от негативного контроля (100%). Действие, направленное на ингибирование роста клеток, может быть оценено исходя из уровня снижения числа живых клеток по сравнению с негативным контролем, и в этом тесте эффект ингибирования клеточного роста наблюдался для всех клонов.

Названия моноклональных антител и номера последовательностей, описанных в настоящей заявке и в прилагаемом графическом материале, систематизированы в нижеследующей таблице.

Таблица 3

Название мышиногo антитела	Вариабельная область Н-цепи	Вариабельная область L-цепи	Название химерного антитела	Гуманизованная вариабельная область (Н-цепи/L-цепи)
1K1422 1K1791	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:8	c1K1422 c1K1791	SEQ ID NO:19 и 23 SEQ ID NO:19 и 24 SEQ ID NO:19 и 25 SEQ ID NO:19 и 26 SEQ ID NO:20 и 23 SEQ ID NO:20 и 24 SEQ ID NO:20 и 25 SEQ ID NO:20 и 26 SEQ ID NO:21 и 23 SEQ ID NO:21 и 24 SEQ ID NO:21 и 25 SEQ ID NO:21 и 26 SEQ ID NO:22 и 23 SEQ ID NO:22 и 24 SEQ ID NO:22 и 25 SEQ ID NO:22 и 26
1K1712	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:9	c1K1712	
1K1402	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:10	c1K1402	
1K1736	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:11	c1K1736	
1K1782	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:12	c1K1782	
1K1924	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17	c1K1924	
1K1228	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:18	c1K1228	

Гибридомы, продуцирующие эти моноклональные антитела, были названы исходя из названий продуцируемых ими антител и были депонированы согласно
Международному договору в Международном депозитарии патентуемых
микроорганизмов Национального Института Новых Промышленных Исследований и
Технологий (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) (Tsukuba
Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) 28 марта, 2006, в
рамках Будапештского договора под регистрационными номерами FERM BP-10587
(1K1422), FERM BP-10591 (1K1791), FERM BP-10588 (1K1712), FERM BP-10586 (1K1402),
FERM BP-10589 (1K1736), FERM BP-10590 (1K1782), FERM BP-10584 (1K0924) и FERM
BP-10585 (1K1228).

Промышленное применение

Настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, обладающему
биологической активностью, подходящей для его использования в качестве
терапевтического средства.

Формула изобретения

1. Мышиное моноклональное анти-CD20-антитело, обладающее активностью,
направленной на ингибирование роста клеток, включая апоптоз клеток,
экспрессирующих человеческий антиген CD20, в культуре клеток, экспрессирующих
антиген CD20 в отсутствие эффекторных клеток, где аминокислотные
последовательности вариабельной области Н-цепи и вариабельной области L-цепи
представляют собой последовательности SEQ ID NO:1 и 7 соответственно или SEQ ID
NO:2 и 8 соответственно.

2. Гибридома, продуцирующая моноклональное анти-CD20-антитело по п.1,
регистрационным номером которой является FERM BP-10587.

3. Гибридома, продуцирующая моноклональное анти-CD20-антитело по п.1,
регистрационным номером которой является FERM BP-10591.

4. Химерное моноклональное анти-CD20-антитело, где аминокислотная

последовательность вариабельной области Н-цепи, представленная в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области L-цепи, представленная в SEQ ID NO:7, слиты с аминокислотными последовательностями константной области Н-цепи и константной области L-цепи человеческого иммуноглобулина соответственно, или аминокислотная последовательность вариабельной области Н-цепи, представленная в SEQ ID NO:2, и аминокислотная последовательность вариабельной области L-цепи, представленная в SEQ ID NO:8, слиты с аминокислотными последовательностями константной области Н-цепи и константной области L-цепи человеческого иммуноглобулина соответственно.

5. Моноклональное анти-CD20-антитело, гуманизованное с использованием аминокислотных последовательностей CDR

вариабельной области Н-цепи, представленной в SEQ ID NO:1, и вариабельной области L-цепи, представленной в SEQ ID NO:7, или

вариабельной области Н-цепи, представленной в SEQ ID NO:2, и вариабельной области L-цепи, представленной в SEQ ID NO:8,

и аминокислотной последовательности человеческого иммуноглобулина.

6. Гуманизованное моноклональное анти-CD20-антитело по п.5, где комбинация аминокислотных последовательностей вариабельной области Н-цепи и вариабельной области L-цепи представляет собой комбинацию последовательностей SEQ ID NO:19 и 23, SEQ ID NO:19 и 24, SEQ ID NO:19 и 25, SEQ ID NO:19 и 26, SEQ ID NO:20 и 23, SEQ ID NO:20 и 24, SEQ ID NO:20 и 25, SEQ ID NO:20 и 26, SEQ ID NO:21 и 23, SEQ ID NO:21 и 24, SEQ ID NO:21 и 25, SEQ ID NO:21 и 26, SEQ ID NO:22 и 23, SEQ ID NO:22 и 24, SEQ ID NO:22 и 25 или SEQ ID NO:22 и 26 соответственно.

7. Моноклональное анти-CD20-антитело по любому из пп.4-6, которое оказывает цитотоксическое действие на клетки, экспрессирующие антиген CD20, в присутствии человеческого комплемента или эффекторных клеток.

8. Клетка млекопитающего, в которую была введена нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность моноклонального анти-CD20-антитела по любому из пп.4-7, благодаря чему продуцируется моноклональное анти-CD20-антитело.

9. Клетка млекопитающего по п.8, которой является клетка СНО.

10. Терапевтическое средство, содержащее эффективное количество моноклонального анти-CD20-антитела по любому из пп.4-7 в качестве активного ингредиента, для лечения неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, хронического лимфолейкоза, острого лимфолейкоза, хронического ревматоидного артрита, аутоиммунной гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, системной красной волчанки, синдрома, ассоциированного с выработыванием антител против фосфолипида, синдрома Сьегрена, болезни Крона, склеродермии, рассеянного склероза или диабета типа 1.

Стр.: 20

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 121

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 122

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 5

```

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

```

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 116
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Thr Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Gly Pro Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 106
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 7
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Met
20 25 30
Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ile Tyr
35 40 45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Thr Ser Asn Pro Cys Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 107
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 8
Ser Thr Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Thr Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu

85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 106
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 106
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 106
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 11
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ser Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Glu Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 12
<211> 107
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 12
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Phe Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Phe Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 35
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер

<400> 13
aatgcggccg ccaccatgac aacacccaga aattc

35

<210> 14
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер

<400> 14
gctctagatt aaggagagct gtcattttc

29

<210> 15
<211> 119
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 15
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Ser Thr Met Ile Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 119
 <212> Бeлoк
 <213> Mus musculus

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Val Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 106
 <212> Бeлoк
 <213> Mus musculus

<400> 17
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 His Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 108
 <212> Бeлoк
 <213> Mus musculus

<400> 18
 Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Val Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu

65					70					75				80	
Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Val	Pro
				85					90					95	
Leu	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 19
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 19															
Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Phe
			20					25					30		
Gly	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ala	Gln	Gly	Phe
	50					55					60				
Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
			85					90						95	
Thr	Arg	Arg	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> 20
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 20															
Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Phe
			20					25					30		
Gly	Val	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Asp	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Met	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
			85					90						95	
Thr	Arg	Arg	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210> 21
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 21															
Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Phe
			20					25					30		
Gly	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
		35				40						45			

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Thr Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 22
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ser Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Thr Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 159
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Ser Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Cys Ala Gly Cys Ala
 100 105 110
 Gly Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly
 115 120 125
 Cys Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 130 135 140
 Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Cys Gly
 145 150 155

<210> 24
 <211> 107
 <212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 107

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 25

```

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

```

<210> 26

<211> 107

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 403

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 27

actagttgca	gctcctat	gggttctttc	tcagatccag	ctggtgcaga	gcggcagcga	60
gctgaagaag	cccggcgcca	gcgtgaaggt	gagctgcaag	gccagcggct	acaccttcac	120
caacttcggc	gtgaactggg	tgcgccaggc	ccccggcaag	ggcctggagt	ggatgggctg	180
gatcaacacc	tacaccggcg	agcccagcta	cgcccagggc	ttcaccggcc	gcttcgtgtt	240
cagcctggac	gccagcgtga	gcaccgccta	cctgcagatc	agcagcctga	aggccgagga	300
caccgccacc	tacttctgca	cccgcgcgac	caactactac	ggcaccagct	actactacgc	360
catggactac	tggggccagg	gcaccaccgt	gaccgtctcg	agc		403

<210> 28

<211> 403

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 28

actagttgca	gctcctat	gggttctttc	tcagatccag	ctggtgcaga	gcggcagcga	60
gctgaagaag	cccggcgcca	gcgtgaaggt	gagctgcaag	gccagcggct	acaccttcac	120
caacttcggc	gtgaactggg	tgaagcaggc	ccccggcaag	ggcctgaagt	ggatgggctg	180
gatcaacacc	tacaccggcg	agcccagcta	cgccgacgac	ttcaagggcc	gcttcgcctt	240
cagcctggac	gccagcgcca	gcaccgccta	cctgcagatc	agcagcctga	aggccgagga	300
catggccacc	tacttctgca	cccgcgcgac	caactactac	ggcaccagct	actactacgc	360
catggactac	tggggccagg	gcaccaccgt	gaccgtctcg	agc		403

<210> 29

<211> 403

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 29

actagttgca	gctcctat	gggttctttc	tcagatccag	ctggtgcaga	gcggcagcga	60
gctgaagaag	cccggcgcca	gcgtgaaggt	gagctgcaag	gccagcggct	acaccttcac	120
caacttcggc	gtgaactggg	tgcgccaggc	ccccggcaag	ggcctgaagt	ggatgggctg	180
gatcaacacc	tacaccggcg	agcccagcta	cgcccagggc	ttcaccggcc	gcttcgcctt	240
cagcctggac	gccagcgtga	gcaccgccta	cctgcagatc	agcagcctga	aggccgagga	300
caccgccacc	tacttctgca	cccgcgcgac	caactactac	ggcaccagct	actactacgc	360
catggactac	tggggccagg	gcaccaccgt	gaccgtctcg	agc		403

<210> 30

<211> 403

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 30

actagttgca	gctcctat	gggttctttc	tcagatccag	ctggtgcaga	gcggccccga	60
gctgaagaag	cccggcgcca	gcgtgaagat	cagctgcaag	gccagcggct	acaccttcac	120
caacttcggc	gtgaactggg	tgaagcaggc	ccccggcaag	ggcctgaagt	ggatgggctg	180
gatcaacacc	tacaccggcg	agcccagcta	cgccgacgac	ttcaagggcc	gcttcgcctt	240
cagcctggac	gccagcgtga	gcaccgccta	cctgcagatc	agcagcctga	aggccgagga	300
caccagcacc	tacttctgca	cccgcgcgac	caactactac	ggcaccagct	actactacgc	360
catggactac	tggggccagg	gcaccaccgt	gaccgtctcg	agc		403

<210> 31

<211> 340

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 31

ccgcggtgcc	agaagcaccg	tgatgaccca	gagccccgac	agcctggccg	tgagcctggg	60
cgagcgcgcc	accatcaact	gcaagagcag	ccagagcggtg	agcaacgacg	tggcctggta	120
ccagcagaag	cccggccaga	gccccaaagg	gctgatctac	ttcgccagca	accgctacag	180
cggcgtgccc	gaccgcttca	gcggcagcgg	ctacggcacc	gaattcacc	tgaccatcag	240
cagcctgcag	gccgaggacg	tggccgtgta	cttctgccag	caggactaca	gcagccccct	300

gaccttcggc gccggcacca agctggagat caagcgtacg 340

<210> 32

<211> 340

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 32

ccgcggtgcc	agaagcaccg	tgatgaccca	gagccccagc	ttcctgagcg	ccagcgtggg	60
cgaccgcgtg	accatcacct	gcaaggccag	ccagagcgtg	agcaacgacg	tggcctggta	120
ccagcagaag	cccggccaga	gccccaaaggt	gctgatctac	ttcgccagca	accgctacac	180
cggcgtgccc	gaccgcttca	gcggcagcgg	ctacggcacc	gacttcaccc	tgaccatcag	240
cagcctgcag	gccgaggacg	tgcccggtgta	cttctgccag	caggactaca	gcagccccct	300
gaccttcggc	gccggcacca	agctggagat	caagcgtacg			340

<210> 33

<211> 340

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 33

ccgcggtgcc	agaagcaccg	tgatgaccca	gagccccgac	agcctggccg	tgagcctggg	60
cgagcgcgcc	accatcaact	gcaagagcag	ccagagcaac	agcaacgacg	tggcctggta	120
ccagcagaag	cccggccaga	gccccaaaggt	gctgatctac	ttcgccagca	accgctacag	180
cggcgtgccc	gaccgcttca	gcggcagcgg	ctacggcacc	gacttcaccc	tgaccatcag	240
cagcctgcag	gccgaggacg	tgcccggtgta	cttctgccag	caggactaca	gcagccccct	300
gaccttcggc	gccggcacca	agctggagct	gaagcgtacg			340

<210> 34

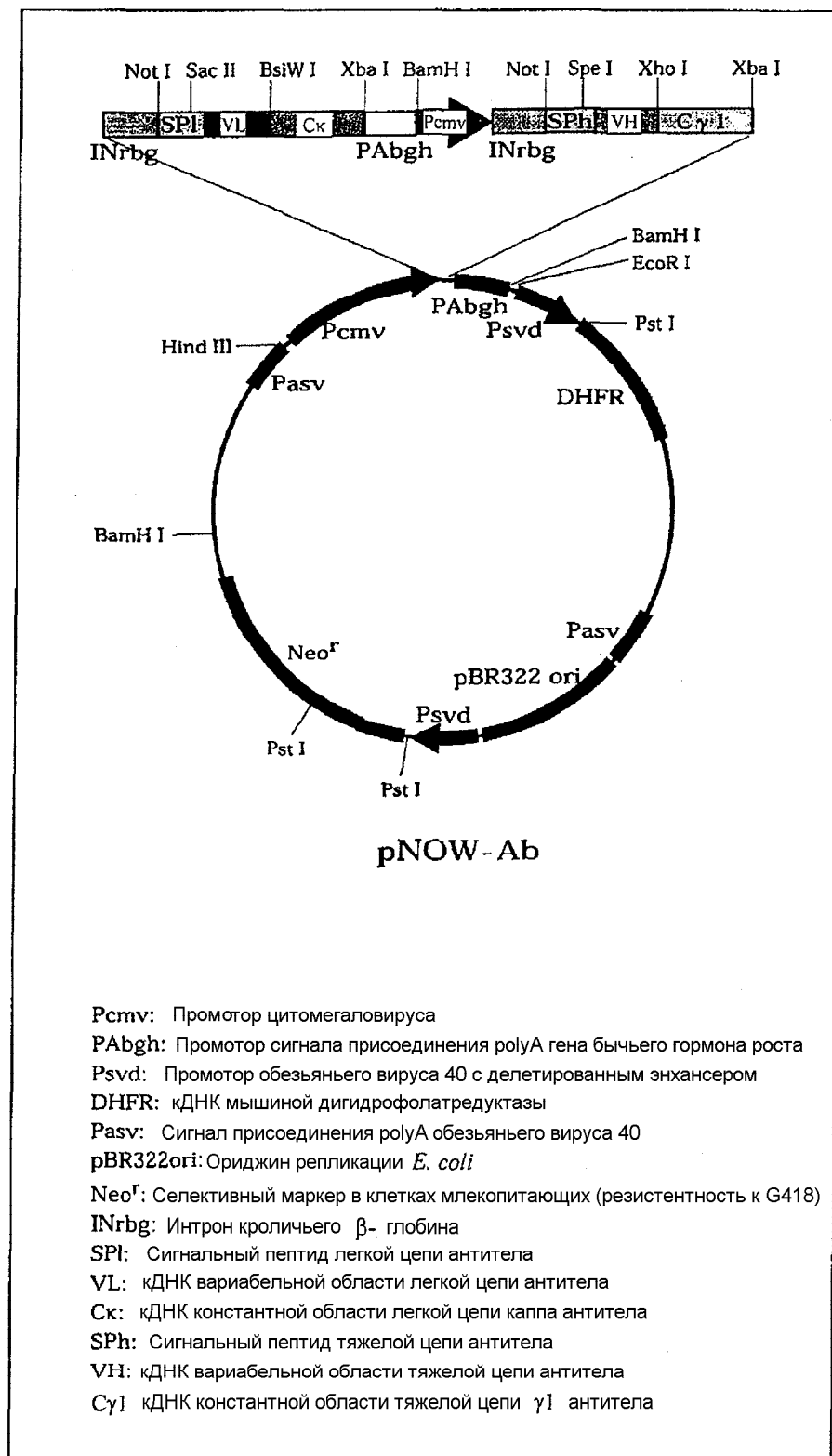
<211> 340

<212> ДНК

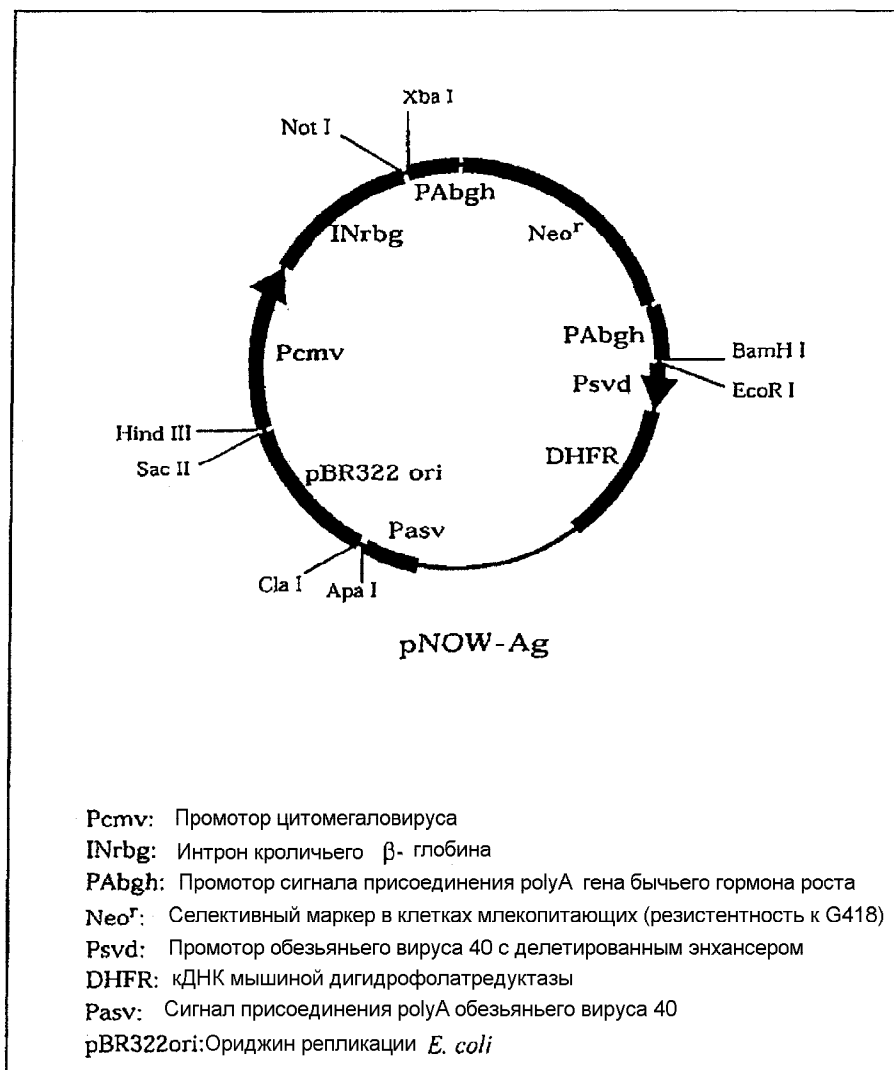
<213> Mus musculus

<400> 34

ccgcggtgcc	agaagcaccg	tgatgaccca	gagccccgac	agcctggccg	tgagcctggg	60
cgagcgcgtg	accatcaact	gcaaggccag	ccagagcgtg	agcaacgacg	tggcctggta	120
ccagcagaag	cccggccaga	gccccaaaggt	gctgatctac	ttcgccagca	accgctacac	180
cggcgtgccc	gaccgcttca	gcggcagcgg	ctacggcacc	gacttcacct	tcaccatcag	240
cagcgtgcag	gccgaggacg	tgcccggtgta	cttctgccag	caggactaca	gcagccccct	300
gaccttcggc	gccggcacca	agctggagct	gaagcgtacg			340



ФИГ.1



ФИГ.2

5'-праймер гена человеческого CD20 (SEQ ID NO: 13)
 hCD20-S-GK-Not aatgcggccgccaccatgacaacacccagaaattc
 3'-праймер гена человеческого CD20 (SEQ ID NO: 14)
 hCD20-E-Xba gctctagattaaggagagctgtcattttc

ФИГ.3

Последовательность V-области H-цепи 1K1422H (SEQ ID NO: 1)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCRASGYFTFTNYNMHWIKQTPGQGLEWIGAIYPGSGDTSYNRKFKGKATLTADTS
 SSTAYMQFSSLTSADSAVYYCARFTYYGGTYGAMDYWGQGSTVTVSL

Последовательность V-области H-цепи 1K1791H (SEQ ID NO: 2)
 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNFGVNVVKKAPGKGLKWMGWINTYTGEPSYADDFKGRFAFSLEAS
 ANTAYLQINNLKNDMSTYFCTRRNTNYGTSYYYAMDYWGQGSTVTVSS

Последовательность V-области H-цепи 1K1712H (SEQ ID NO: 3)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTSYNLHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGSGDTSYNQKFKGKATLTADKS
 SNTAYMQLNSLTSEDSAVYCCARSAMISTGNWYFDYWGQGTTLTVSS

Последовательность V-области H-цепи 1K1402H (SEQ ID NO: 4)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARFYYYGSMGAMDYWGQGSTVTVSS

Последовательность V-области H-цепи 1K1736H (SEQ ID NO: 5)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTFTYNLHWVKQTPGQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKVKATLTADKS
 SNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWIYYGNYEGTLDYWGQGSTVTVSS

Последовательность V-области H-цепи 1K1782H (SEQ ID NO: 6)
 QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYFTFTSYMMHWVKQRPQGLEWIGYITPSTGYTDYNKKFKDKATLTADRS
 SSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARSGPYFDVWGAGTTTVSS

Последовательность V-области L-цепи 1K1422L (SEQ ID NO: 7)
 QIVLTQSPPIMSASLGEEITLTCASSRVSYMLWYQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTIS
 SVEAEDAADYYCHQWTSNPCTFGGCKLEIK

Последовательность V-области L-цепи 1K1791L (SEQ ID NO: 8)
 STVMTQTPKFLLVSAQDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKVLIIYFASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTI
 NTVQAEDLAVYFCQDYSSPLTFGAGTKLELK

Последовательность V-области L-цепи 1K1712L (SEQ ID NO: 9)
 QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS
 RVEAEDTATYYCQQWTFNPPTFGSGCKLEIK

Последовательность V-области L-цепи 1K1402L (SEQ ID NO: 10)
 QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCRASSSVSYMHYQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIT
 RVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGAGTKLELK

Последовательность V-области L-цепи 1K1736L (SEQ ID NO: 11)
 QIVLSQSPAILSSSPGKVTMTCRASSSVSYMLWYQQKPGSSPEPWIYATSNLASGVPARFSGGSGSGTSYSLTIS
 RVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGGCKLEIK

Последовательность V-области L-цепи 1K1782L (SEQ ID NO: 12)
 DILLTQSPAILFVSPGERVSLSCRASQNIQTSIHWWYQRTNGSPRLLIKYASESFGIPSRFSGSGSGTDFTLISI
 NSVESEDIADYYCQNSNPPTFGSGCKLEIK

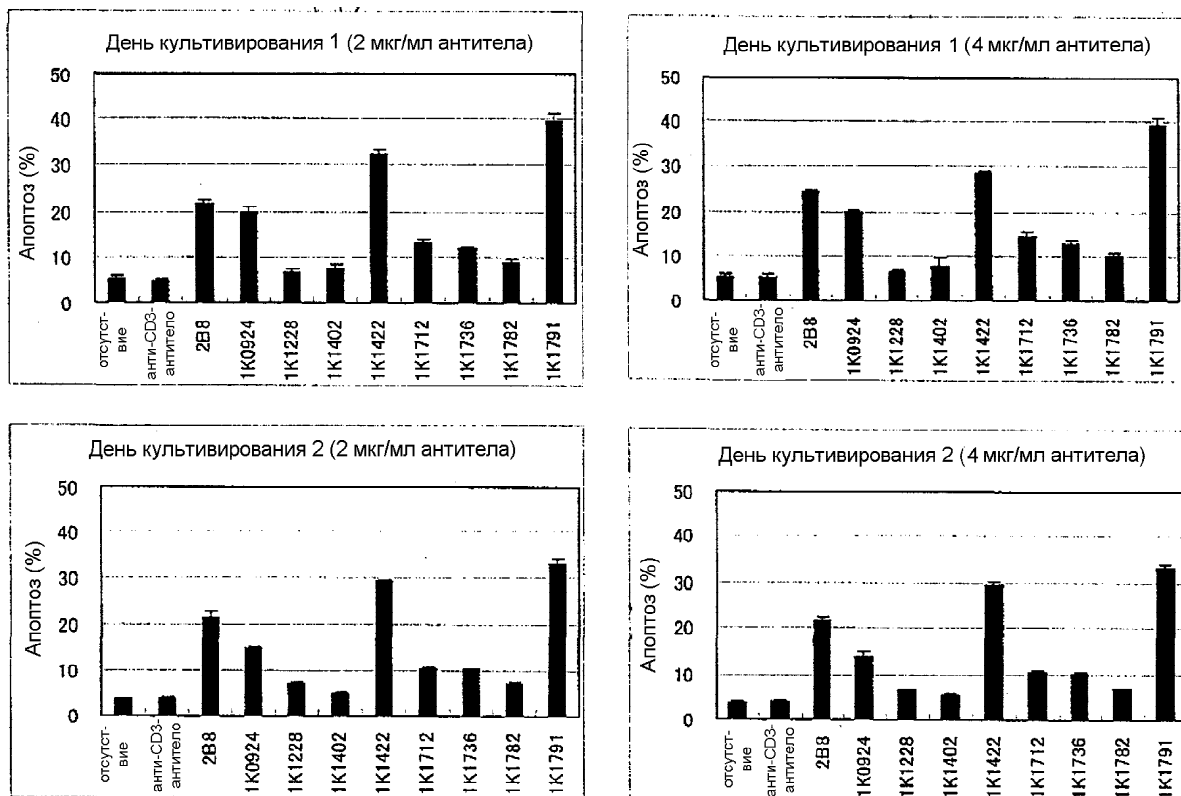
Последовательность V-области L-цепи 1K0924H (SEQ ID NO: 15)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTFTSYNIHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTSDKS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARMSTMITGFDYWGQGTTLTVSS

Последовательность V-области L-цепи 1K1228H (SEQ ID NO: 16)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKVSCASGFTFTSYNLHWVKQTPGQGLVWIGAIYPGNGDTSYNQKFRGKATLTADIS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYYGYDAMDYWGQGSTVTVSS

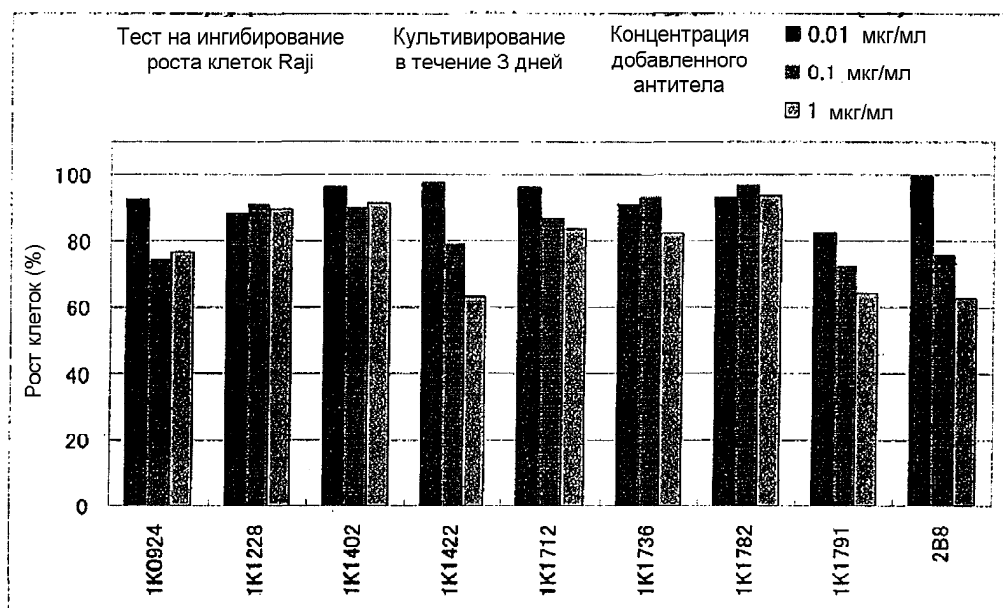
Последовательность V-области L-цепи 1K0924L (SEQ ID NO: 17)
 QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCRASSSVSYMHYQQRPQSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYYFTIS
 RVEAEDAATYYCQWNSNPPTHGGCKLEIK

Последовательность V-области L-цепи 1K1228L (SEQ ID NO: 18)
 EIILTQSPPTMAASPGKITITCSASSSISYYLRWYQQKPGFSPKVLIIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIG
 TMEAEADVATYYCQGNTPVPLTFGSGCKLEIK

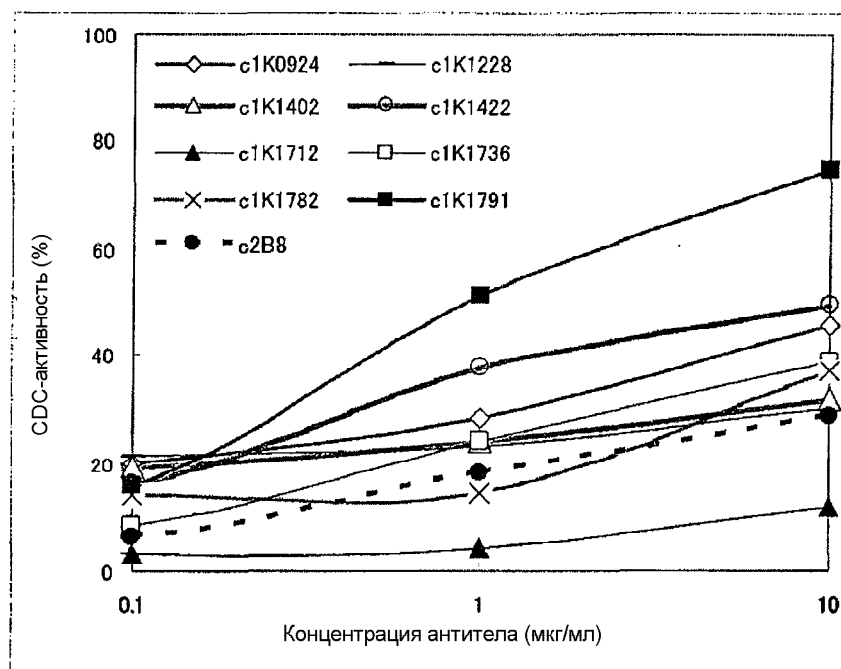
ФИГ. 4



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

Последовательность V-области H-цепи гуманизованного антитела (abbH1791) (SEQ ID NO: 19)
 QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLEWMGW INTYTGEPST
 AQGFTGRFVF SLDASVSTAY LQISSLKAED TATYFCTRRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Пример последовательности V-области H-цепи гуманизованного антитела (abbH1791) (SEQ ID NO: 27)
 ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG
 CCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCCA
 GGGCTTCACCGCGCGCTTCGTGTTGAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACCAGCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCGCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Последовательность V-области H-цепи гуманизованного антитела (fraH1791) (SEQ ID NO: 20)
 QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPST
 ADDFKGRFAF SLDASASTAY LQISSLKAED MATYFCTRRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Пример последовательности V-области H-цепи гуманизованного антитела (fraH1791) (SEQ ID NO: 28)
 ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA
 GCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCGA
 CGACTTCAAGGGCGCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGCCAGCACCAGCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACATGGCCACCTACTTCTGCACCGCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Последовательность V-области H-цепи гуманизованного антитела (sdrH1791) (SEQ ID NO: 21)
 QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPST
 AQGFTGRFAF SLDASVSTAY LQISSLKAED TATYFCTRRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Пример последовательности V-области H-цепи гуманизованного антитела (sdrH1791) (SEQ ID NO: 29)
 ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG
 CCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCCA
 GGGCTTCACCGCGCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACCAGCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCGCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Последовательность V-области H-цепи гуманизованного антитела (venH1791) (SEQ ID NO: 22)
 QIQLVQSGPE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPST
 ADDFKGRFAF SLDASVSTAY LQISSLKAED TSTYFCTRRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Пример последовательности V-области H-цепи гуманизованного антитела (venH1791) (SEQ ID NO: 30)
 ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA
 GCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCGA
 CGACTTCAAGGGCGCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACCAGCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCGCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

ФИГ.8А

Последовательность V-области L-цепи гуманизованного антитела(abbL1791) (SEQ ID NO:23)
 STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVS NDVAWYQKP GQSPKVLIIYF ASNRYSGVPD
 RFSGSGYGT DFTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

Пример последовательности V-области L-цепи гуманизованного антитела(abbL1791)(SEQ ID NO:31)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCAC
 CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGCGCTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

Последовательность V-области L-цепи гуманизованного антитела (fraL1791) (SEQ ID NO:24)
 STVMTQSPSF LSASVGRVT ITCASQSVS NDVAWYQKP GQSPKVLIIYF ASNRYTGVPD
 RFSGSGYGT DFTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

Пример последовательности V-области L-цепи гуманизованного антитела(fraL1791)(SEQ ID NO:32)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGAC
 CATCACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGCGCTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

Последовательность V-области L-цепи гуманизованного антитела (sdrL1791) (SEQ ID NO:25)
 STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVS NDVAWYQKP GQSPKVLIIYF ASNRYSGVPD
 RFSGSGYGT DFTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

Пример последовательности V-области L-цепи гуманизованного антитела(sdrL1791)(SEQ ID NO:33)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCAC
 CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCAACAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGCGCTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

Последовательность V-области L-цепи гуманизованного антитела (venL1791) (SEQ ID NO:26)
 STVMTQSPDS LAVSLGERVT INCKASQSVS NDVAWYQKP GQSPKVLIIYF ASNRYTGVPD
 RFSGSGYGT DFTTISSVQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

Пример последовательности V-области L-цепи гуманизованного антитела(venL1791)(SEQ ID NO:34)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGTGAC
 CATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGCGCTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCGTGAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

ФИГ.8В