



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 455 360** (13) **C1**

(51) МПК

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011105309/10, 15.02.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.02.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.02.2011

(45) Опубликовано: 10.07.2012 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 02/029015 A1, 11.04.2002. US 4,902,614 B2, 20.02.1990. US 4,696,895 B2, 29.09.1987. WAKABAYASHI et al. "Conformation-specific monoclonal antibodies to the Calcium-induced structure of protein C", The Journal of biological chemistry, 1986, vol.261, no.24, с.11097-1105. Протеин С (AMAX ACCUCOLOR Protein C), номер по каталогу: CRS 101 A, AMAX (см. прод.)

Адрес для переписки:

196158, Санкт-Петербург, Московское ш., 10,
кв.184, В.М. Белкову

(72) Автор(ы):

Ковнир Сергей Владимирович (RU),
Орлова Надежда Александровна (RU),
Воробьев Иван Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

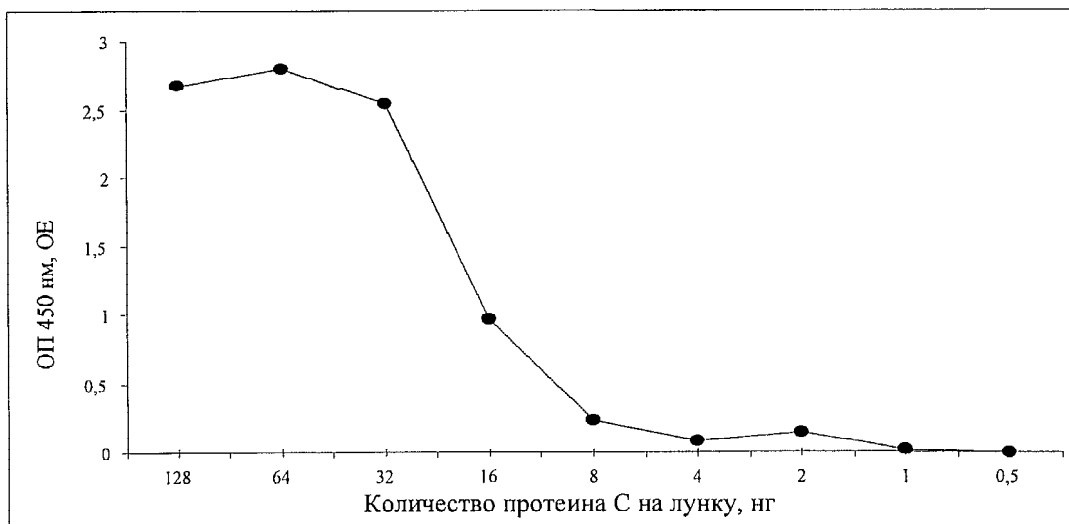
Общество с ограниченной
ответственностью "Инновационный центр
"Новые технологии и материалы" (ООО
"ИЦ Новтехмат") (RU)

(54) ШТАММ ГИБРИДНЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК МЫШИ Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ПРОТЕИНУ С ЧЕЛОВЕКА, МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНОЕ К ПРОТЕИНУ С ЧЕЛОВЕКА, И ИММУНОСОРБЕНТ ДЛЯ СОБЫТИИ ПРОТЕИНА С ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИЙ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии. Описан штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 - продуцент моноклонального антитела, специфичного к протеину С человека (к hPROC). Штамм депонирован в Российской коллекции Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН под номером 733(Д). Описано моноклональное антитело, полученное из штамма, специфичное к hPROC и обладающее

конформационно зависимыми свойствами. Оно связывает hPROC в присутствии ионов кальция и не связывает его в присутствии хелатирующих агентов. Предложен иммуносорбент на основе указанного антитела. Изобретение может быть использовано для получения МКА к hPROC и создания на его основе иммуоаффинного сорбента для очистки и концентрирования hPROC. 3 н.п. ф-лы, 2 ил., 3 табл., 5 пр.



Фиг.2

(56) (продолжение):

ACCUCOLOR Protein C, "TRINITY BIOTECH", Перевод на русский язык ЗАО "Аналитика", М., 2006, [Найдено 05.12.2011 г.], Найдено из Интернета: www.analytica.ru/instructions/koagulology/.../CRS101A-protein-C.pdf.

RU 2 4 5 5 3 6 0 C 1

RU 2 4 5 5 3 6 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12P 21/08 (2006.01)*C12N 5/20* (2006.01)*C07K 16/18* (2006.01)*C07K 16/36* (2006.01)*G01N 33/577* (2006.01)*G01N 33/543* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011105309/10, 15.02.2011**(24) Effective date for property rights:
15.02.2011

Priority:

(22) Date of filing: **15.02.2011**(45) Date of publication: **10.07.2012 Bull. 19**

Mail address:

**196158, Sankt-Peterburg, Moskovskoe sh., 10,
kv.184, V.M. Belkovu**

(72) Inventor(s):

**Kovnir Sergej Vladimirovich (RU),
Orlova Nadezhda Aleksandrovna (RU),
Vorob'ev Ivan Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Innovatsionnyj tsentr "Novye tekhnologii i
materialy" (OOO "ITs Novtekhmat") (RU)**

(54) CULTIVATED HYBRID CELL STRAIN OF MOUSE Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 - PRODUCER OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO HUMAN PROTEIN C, MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO HUMAN PROTEIN C AND IMMUNOSORBENT FOR HUMAN PROTEIN C SORPTION CONTAINING MONOCLONAL ANTIBODY

(57) Abstract:

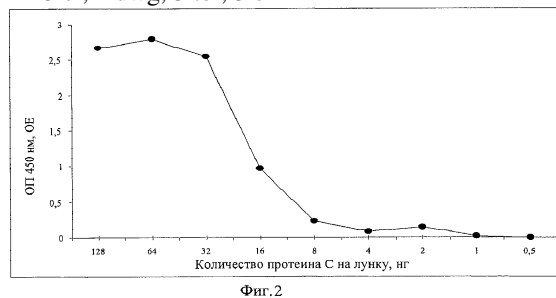
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is described is a hybrid cultured cell strain of the animals *Mus mus* Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 that is a produced of a monoclonal antibody specific to human protein C (to hPROC). The strain is deposited in the Russian Collection of Vertebrata Cell Culture of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, No. 733(D). What is described is a monoclonal antibody prepared of the strain, specific to hPROC and showing the conformational properties. It binds hPROC in the presence of calcium ions and does not bind it in the presence of chelating agents. What is presented is an

immunosorbent on the basis of said antibody.

EFFECT: applicability of the strain for preparing the MCA to hPROC, and producing on its basis an immune-affine sorbent for hPROC purification and concentration.

3 cl, 2 dwg, 3 tbl, 5 ex



Область техники

Изобретение относится к области биотехнологии и биофармацевтики, а именно к технологии получения моноклональных антител (МКА) методами клеточной гибридизации, точнее к методам получения МКА, специфичных к протеину С человека (hPROC), и создания на основе этих МКА иммуноаффинного сорбента для выделения, очистки и анализа протеина С человека из культуральной жидкости продуцентов рекомбинантного протеина С (rhPC) либо из природных источников (плазмы крови).

Предшествующий уровень техники

Протеин С является витамин К-зависимым белком плазмы крови. Он входит в систему гемостаза и играет исключительно важную роль в регулировании свертывания крови. Протеин С синтезируется в виде неактивной молекулы предшественника, проходит многостадийный пост-трансляционный процессинг в клеточных компартментах и секретируется в виде интактной (зимогенной) формы. Активация белка С происходит в кровотоке при участии тромбомодулин-тромбинового комплекса. Активированный протеин С вместе с кофактором протеином S выполняет антикоагулянтную функцию. Механизм действия активированного протеина С и механизм активации зимогена в активную протеазу изложен в работе Esmon T. Charles ("Protein-C: biochemistry, physiology, and clinical implications". Blood, 1984, Vol.62 (6), P.1155-8).

Активация протеина С непосредственно осуществляется тромбином, последней сериновой протеазой каскада свертывания крови и опосредована связанным с мембраной эндотелиальных клеток гликопротеином тромбомодулин. Тромбомодулин образует прочный нековалентный комплекс состава 1:1 с тромбином и полностью меняет функциональные свойства тромбина. Свободный тромбин в нормальных условиях активирует тромбоциты, конвертирует фибриноген до фибрина и факторы свертывания крови V и VIII до активных формы Va и VIIIa. В то же время тромбин в комплексе с тромбомодулином теряет все вышеуказанные свойства, но эффективно активирует интактный протеин С при физиологических концентрациях ионов кальция.

Активированный протеин С, в свою очередь, избирательно инактивирует активированные формы факторов свертываемости крови V и VIII, но не их исходные формы. Следует отметить, что основные события при запуске каскада свертывания крови происходят на поверхности клеток и требуют участия мембранно-связанных белков и фосфолипидов, в то время как факторы V и VIII свободно циркулируют в кровотоке и участвуют в петле положительной обратной связи при работе системы свертывания. При их активации тромбином они ускоряют активацию фактора X и протромбина на 5 порядков и резко ускоряют генерацию тромбина в месте запуска каскада свертывания.

Таким образом, физиологическая роль активированного протеина С может быть описана как ограничение области запуска системы свертывания крови.

Основным кофактором активированного протеина С является протеин S, другой витамин К - зависимый белок плазмы крови. Протеин S более чем в 10 раз усиливает вызываемую активированным протеином С деградацию факторов Va и VIIIa.

Протеин С является важным терапевтическим агентом (EP 215549, EP 0191606) в качестве специфического антикоагулянта, имеющего потенциально более широкую область применения, чем традиционные антикоагулянты гепарин, варфарин (оксикумарин) или производные последнего. В отличие от традиционных антикоагулянтов активированный или интактный протеин С не воздействуют на

систему свертывания крови до момента появления тромбина и не вызывают падения концентрации зимогенных белков системы свертывания. Вследствие этого антикоагулянтная терапия протеином С потенциально является более безопасной, поскольку не вызывает постоянного риска возникновения кровотечений. Экзогенный интактный протеин С также может использоваться для заместительной терапии при наследственном дефиците протеина С, вызывающего смерть в младенческом возрасте при гомозиготном дефиците и частые тромбозы при гетерозиготной форме дефицита.

Основной областью клинического применения активированного протеина С являются опасные для жизни тромботические состояния, в первую очередь синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), возникающий, в том числе, при развитии острого сепсиса.

Активированный протеин С является маркером сепсиса, а его уровень и дефицит интактного протеина С коррелируют с тяжестью течения заболевания. Так, дефицит протеина С наблюдается более чем у 85% больных с тяжелым сепсисом. Также дефицит протеина С коррелирует с неблагоприятными клиническими исходами, такими как септический шок (тяжелый сепсис, сопровождающийся развитием артериальной гипотонии), ДВС-синдромом и полиорганной недостаточностью.

Поскольку концентрация протеина С в плазме крови довольно мала и его отделение от других витамин К-зависимых белков системы гемостаза представляется весьма затруднительным, наилучшим способом получения активированного протеина С для медицинского применения является биосинтез, активация и очистка рекомбинантного белка. Наличие у протеина С так называемого Gla-домена, то есть кластера близкорасположенных остатков гамма-карбоксилированной глутаминовой кислоты необходимо для проявления антикоагуляционных свойств белка. Это обусловлено конформационными изменениями, которые претерпевает Gla-домен при связывании ионов кальция, что в свою очередь делает возможным превращение зимогенной формы протеина С в активную сериновую протеазу (Church W.L. et al. Discrimination of normal and abnormal prothrombin and protein C in plasma using a calcium ion-inhibited monoclonal antibody to a common epitope on several vitamin K-dependent proteins. Blood, 1989, Vol.74 (7), P.2418-25). Такие конформационные изменения, механизм которых известен и технически контролируем, могут быть положены в основу технологических решений для выделения протеина С и его активации.

Одним из важных подходов определения, очистки и концентрирования природного протеина С и его рекомбинантных вариантов в биомедицинских приложениях является использование конформационно-специфических МКА, продуцируемых гибридами.

Известно применение моноклональных антител к протеину С, описанное в патенте компании Baxter AG (Us. Pat. №5549893; Johann Eibi et al;" Use of protein C in the treatment of purpura fulminans"; 1995) защищающего терапевтическое применение активированного и неактивированного протеина С природного происхождения.

Применение конформационно-зависимых антител для очистки и активации протеина С является объектом защиты в патенте компании Elli Lilly & Co. (Us. Pat. №4981952; Betty Yan S.; "Method for the purification of vitamin K-dependent proteins" 1989). Техническое решение основано на серии последовательных раундов хроматографии с аффинным сорбентом на основе МКА, связывание которых с протеином С блокируется ионами кальция. Поскольку многие внеклеточные протеазы более активны в присутствии ионов кальция, наиболее предпочтительным решением

являлось бы использование МКА, связывающих протеин С в присутствии ионов кальция, и не связывающих в присутствии хелатирующих агентов, т.е. при полном отсутствии ионов кальция в растворе. При проведении аффинной хроматографии с такими иммобилизованными МКА активность остаточных контаминирующих протеаз в растворе элюированного протеина С была бы минимальной и в меньшей степени приводила бы к распаду протеина С и его преждевременной активации. Известно применение конформационно-зависимых антител для анализа биологической активности и разделения модифицированных форм протеина С. Для таких целей могут быть использованы хелатор-зависимые антитела (Church W.L. et al. Discrimination of normal and abnormal prothrombin and protein C in plasma using a calcium ion-inhibited monoclonal antibody to a common epitope on several vitamin K-dependent proteins. Blood, 1989, Vol.74 (7), P.2418-25; Vincenot A. et al. Amino acids 225-235** of the protein C serine-protease domain are important for the interaction with the thrombin-thrombomodulin complex. FEBS Letters, 1995, Vol.367 (2), P.153-7) и кальций-зависимые антитела (Ohsawa k. et al. Purification of sufficiently gamma-carboxylated recombinant protein C and its derivatives. Calcium-dependent affinity shift in immunoaffinity and ion-exchange chromatography. J. Chromatography, 1992, Vol.597 (1-2), P.285-91; Stearns D.J, et al. The interaction of a Ca^{2+} -dependent monoclonal antibody with the protein C activation peptide region. Evidence for obligatory Ca^{2+} binding to both antigen and antibody. J. Biol. Chem. 1988, Vol.263 (2), P.826-32; Nakamura S., Sakata Y. Immunoaffinity purification of protein C by using conformation-specific monoclonal antibodies to protein C-calcium ion complex. Biochim Biophys Acta. Biochim. Biophys. Acta. 1987, Vol.925 (2), P.85-93; Wakabayashi K. Conformation-specific monoclonal antibodies to the calcium-induced structure of protein C. J. Biol. Chem. 1986, Vol.261 (24), P.11097-105). Предположительно, все вышеуказанные антитела связываются с протеином С в области Gla-домена, при этом узнаваемый ими эпитоп либо включает координированный ион кальция, либо маскируется таким координированным ионом.

Существует широкий спектр возможностей для дальнейшего усовершенствования существующих промышленных решений по очистке протеина С человека и его рекомбинантных вариантов. Возможность такой оптимизации обусловлена тем, что при отборе клонов гибридом, продуцирующих МКА, обладающих конформационно-зависимыми свойствами можно комбинировать различные факторы, влияющие на конформацию целевого антигена. Среди таких факторов можно назвать использование хелатирующих и хаотропных агентов, буферных растворов для элюции антител с разной ионной силой и введение в раствор для связывания антител и антигена различных двухвалентных ионов металлов, с последующим масштабированием оптимальной методики до уровня промышленной хроматографии (Tharakan J.P. Effect of feed flow-rate, antigen concentration and antibody density on immunoaffinity purification of coagulation factor IX. J. Chromatography, 1990, Vol.522, P.153-62; Verlander W.H. et al. Technological challenges for large scale purification of protein C. Protein C and related anticoagulants. Ed. by Bruley D.F. and Drohan W.N., 1990, Vol.11, P.11-27). Кроме того, каждая белковая структура несет на своей поверхности определенное количество эпитопов, в том числе ассоциированных со структурными доменами. Как правило, чем выше молекулярный вес белка, тем больше эпитопов. Они имеют разную иммуногенность и в случае семейства витамин К-зависимых белков моноклональные антитела могут быть использованы не только для очистки целевого белка, но и для активации его зимогенной формы. Поэтому, чем больше панель гибридом, продуцирующих антитела к конформационно-лабильными

эпитопам, тем больше инструментов для очистки изоформ целевого белка, исследования и модификации его свойств. Следовательно, получение новых гибридом всегда актуально.

Подробное описание настоящего изобретения

Технической задачей, решаемой авторами, являлось создание метода получения конформационно-зависимых высокоаффинных антител к протеину С человека, применимых для биофармацевтического производства, а именно для аффинной очистки рекомбинантного протеина С человека (rhPROC).

Технический результат достигался путем создания нового штамма гибридных культивируемых клеток Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3, секретирующих моноклональные антитела к протеину С человека и создания на их основе иммуносорбента для очистки рекомбинантного протеина С человека. Полученный штамм депонирован в Российской Коллекции Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН за номером 733 (Д) от 16.03.2010.

Основным методическим подходом к созданию штаммов клеточных линий, продуцирующих моноклональные антитела, является клонирование гибридом. Гибридомы получают слиянием несекретирующих клеток миеломы и антител-продуцирующих В-лимфоцитов в присутствии полиэтиленгликоля. Клетки миеломы дефицитны по гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазе (HGPRT) или тимидинкиназе (ТК). Таким образом, они не могут выжить при культивации в среде, содержащей добавку НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин). В то же время любые не слитые В-лимфоциты селезенки сам по себе не стабильны в культуре более трех дней.

Таким образом, гибридные клетки В-лимфоцитов и миеломы, содержащие генетическую информацию обоих родительских клеток, должны обладать стабильностью в селективной среде, содержащей НАТ. Они могут культивироваться продолжительное время и продуцировать потенциально неограниченное количество антител.

Супернатанты культуры гибридом анализируют на наличие целевых антител методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Затем отобранные гибридомы клонируют для того, чтобы получить субклоны, продуцирующие моноклональные конформационно-зависимые антитела. Для этого в метод ИФА вносятся изменения, благодаря которым имитируются элюирующие условия хроматографической очистки, изменяющие аффинность антител в зависимости от конформации антигена (Pepper S.D. Selection antibodies for immunoaffinity chromatography // Methods in molecular biology ed. by Kenney A. and Fowell S., 1992, Vol.11, P.136-171). Отобранный продуцент моноклонального антитела может быть масштабирован in vivo в виде асцита мыши или in vitro в суспензионной культуре (Kohler J., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, Vol.256 (5517), P.495-7).

Термин «моноклональное антитело» означает антитело, искусственно получаемое из клеточного клона и поэтому содержащее только один тип иммуноглобулина.

Антитело, специфичное к белку "протеин С человека", означает молекулу, которая селективно, избирательно связывается с протеином С человека и образует стабильный комплекс. Стабильным комплексом является комплекс, в котором связывание между партнерами происходит на период времени, достаточный для того, чтобы произвести детектирование указанного комплекса. Термин "селективно связывается с протеином С человека" означает способность указанной молекулы предпочтительно связываться

с протеином С человека в отличие от связывания с белками, не имеющими отношения к протеину С человека или связывания с небелковыми компонентами, присутствующими в образце. Антителом, которое предпочтительно связывается с протеином С человека, является антитело, которое связывается с протеином С человека, но не связывается в существенной степени с другими молекулами или компонентами, которые могут присутствовать в образце. Существенное связывание предполагает, например, связывание антитела, связывающегося с протеином С человека, с молекулой, не являющейся протеином С человека, с аффинностью или силой, достаточной для того, чтобы помешать способности антитела, связывающегося с протеином С человека.

Способность антитела к связыванию с антигеном может быть определена специалистом в данной области с использованием методов, включающих, но не ограничивающихся методами ELISA и равновесного диализа. Методы определения аффинности и силы связывания хорошо известны специалисту в данной области техники и подробно описаны, например, Janeway и др. (Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (Garland Publishing Company, 1996)).

Методика иммунизации. Штамм гибридомы получают путем иммунизации мышей линии Balb/c рекомбинантным активированным протеином С человека в течение 49 суток. На третьи сутки после последней бустер-инъекции проводят гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей ($1,2 \times 10^6$ клеток) с клетками мышиной миеломы Sp2/0-Ag14 (3×10^7 клеток). В качестве агента для слияния применяют полиэтиленгликоль с молекулярным весом 1450 (Sigma, Германия). После гибридизации проводят селекцию, скрининг, клонирование и криоконсервацию гибридомы.

Морфологическая характеристика гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3

Культура гибридных клеток состоит из слабо прикрепленных к подложке округлых клеток с размером с исходную миеломную клетку.

Культуральные свойства. Культивирование штамма гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 ведут при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Средой культивирования является среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 8 мкг/мл тилозина. Клетки культивируют в виде стационарной суспензии в вентилируемых пластиковых флаконах с адгезионной поверхностью площадью 25 см^2 и рабочим объемом среды 5-10 мл. Пассирование клеток гибридомы проводят 3 раза в неделю с кратностью разведения 1:4-1:6. Посевная концентрация клеток составляет 3×10^5 1 мл среды.

Максимальная концентрация гибридных клеток при культивировании составляет $1,2 \times 10^6$ на 1 мл среды. Гибридный клон не теряет способности синтеза антител при 12 последовательных пассажах in vitro.

Культивирование гибридомы в организме животного. Вид животного - инбредные мыши линии BALB/c. Доза клеток при прививке составляет 2×10^6 клеток/0,5 мл фосфатно-солевого буферного раствора на одну мышь при первичном введении. За 1 сутки до введения клеток гибридомы мышам внутрибрюшинно вводят 1 мл неполного адьюванта Фрейнда. Иммуноасцитическая жидкость образуется на 12-16 сутки в объеме 3-5 мл. Количественное определение иммуноглобулина, продуцируемого гибридомой, производят методом непрямого иммуно ферментного анализа (ИФА).

Характеристика полезного продукта. Гибридома Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 продуцирует специфичные моноклональные антитела к протеину С человека, титр которых составляет в культуральной жидкости (КЖ) 1:90000, в иммуноасцитической

жидкости (ИАЖ) 1:200 000. Моноклональные антитела из КЖ и ИАЖ выделяют с помощью осаждения сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на белок А или G сефарозе. Гомогенность выделенных антител проверяется с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Принадлежность к классу иммуноглобулинов G определяется по иммуноферментному анализу класс-специфическими антивидовыми антителами.

Продуктивность штамма. Продукция МКА в среде культивирования составляет 20-50 мкг/мл при времени культивирования 72 ч и посевной концентрации гибридомы 0,3 млн кл/мл; в асцитической жидкости - 1-4 мг/мл. Продукция МКА в культуральной жидкости сохраняется на протяжении 12 последовательных пассажей и воспроизводится при прививании в виде асцитных опухолей на мышах.

Контаминация штамма. Контаминанты гибридной линии, включая бактерии и грибы, методом прямого посева на питательные среды LB и Сабуро-Эммонса не обнаружены; микопlasма по ПЦР и флуоресцентному анализу не обнаружена; вирусы - нет данных.

Криоконсервация производится аликвотами ресуспендированных клеток по 3×10^6 кл./мл. Ампулы содержат 1,0 мл криозащитной среды, содержащей эмбриональной телячьей сыворотки - 90%, диметилсульфоксида - 10%. Режим криоконсервации и отогрева. Гибридные клетки вносят в криоампулы, помещают в контейнер с теплоносителем изопенталом и помещают в низкотемпературный холодильник для охлаждения со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до достижения температуры -70°C и затем помещают в жидкий азот. Размораживание проводят быстро на водяной бане при температуре $+37^\circ\text{C}$. Жизнеспособность восстанавливаемых гибридом после криоконсервации составляет 80-90%.

Иммуносорбент. Для получения иммуносорбента в качестве носителя используют твердофазные носители, в том числе различные гранулированные сорбенты, например агарозу, содержащую ковалентно связанные с ней лиганды. Для иммобилизации очищенного МКА Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 использовали сорбент с аминокреактивными привитыми группами N-гидроксисукцинимидом NHS-activated Sepharose 4 FF (GE LifeSciences, США). Показана возможность использования заявляемых МКА в качестве лиганда для получения иммуносорбента для сорбции протеина С.

Полезным продуктом является гибридома и продуцируемые ей моноклональные антитела, относящиеся к классу IgG иммуноглобулинов мыши, специфичные к протеину С человека, а также иммуносорбент для сорбции протеина С человека. Особенности полученных моноклональных антител (МКА) и результаты их практического применения изобретения приведены на следующих фигурах.

Краткое описание рисунков

На Фигуре 1 показан критерий отбора поликлональных пулов гибридом, соотношение с верхним 5% процентилем. Ось X - оптическая плотность OD при длине волны $\lambda=450$ нм, ось Y - количество колоний с активностью в интервале $d=0.010D$. Заполненный точками столбик - верхний 5% процентиль ($n=17$), заштрихованный столбик - критерий отбора по уровню сигнала ($OD_{450}>0.1$, $n=48$).

На Фигуре 2 показано определение rhPC твердофазном ИФА с использованием МКА гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3.

Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже со ссылкой на следующие не ограничивающие настоящее изобретение примеры.

Пример 1. Получение гибридомы

Иммунизация

Мышей линии BALB/c возраста 8-10 недель в количестве 8 штук иммунизируют рекомбинантным активированным протеином С человека (rhPC, лекарственное средство дротрекогин альфа) по схеме:

- внутрибрюшинное введение мышам 200 мкг rhPC в полном адьюванте Фрейнда;
- через 21 сутки повторное введение мышам 500 мкг rhPC в неполном адьюванте Фрейнда;
- через 35 суток внутривенная инъекция мышам 500 мкг rhPC в неполном адьюванте Фрейнда;
- через 42 суток отбор образцов крови из орбитального синуса, определение животных с наилучшим титром антител к протеину С в сыворотке по ИФА;
- выбранным животным еще через 7 суток производится бустерная внутривенная инъекция 200 мкг rhPC в физиологическом растворе;
- через 7 суток содержания бустированных мышей производится повторный отбор образцов крови из орбитального синуса на ИФА. Производится финальное бустирование животного с максимальным титром антител к rhPC: внутривенная инъекция 200 мкг rhPC в физиологическом растворе.

Гибридизация.

Через 3 суток после последней внутривенной инъекции извлекают селезенку мыши и проводят гибридизацию спленоцитов иммунных мышей (1.2×10^7 клеток) с клетками мышинной миеломы Sp2/0-Ag14 (3×10^7 клеток) в присутствии 1 мл 50% раствора полиэтиленгликоля (Sigma, США) с молекулярным весом 1450 в течение 1 минуты. Затем в течение 15 минут последовательными двойными разведениями доводят объем до 16 мл, добавляя по каплям безсывороточную среду RPMI-1640. Разведенную гибридизационную суспензию инкубируют 1 час при 37°C в 150 мл полной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Селекция.

После инкубации клетки высевают на 96-луночные планшеты на слой перитонеальных макрофагов, взятых у мышей линии BALB/c. Селекцию гибридных клеток проводят на селективной в среде с добавкой НАТ (10 мМ гипоксантина, 40 мкМ аминоптерина, 1,6 мМ тимидина). Через 14 суток из среды убирают аминоптерин. В последующем культивирование проводят на среде A-DMEM/F-12 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 8 мкг/мл тилозина.

Оценка продуктивности первичных пулов.

Для отбора положительных первичных пулов, продуцирующих МКА, используют твердофазный ИФА.

Для проведения ИФА в лунки 96-луночного полистиролового планшета для иммуноферментного анализа вносят по 100 нг rhPC, разведенного в фосфатно-солевом буферном растворе (ФБР; состав - 1,7 мМ KH_2PO_4 , 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 7,4) в объеме 100 мкл и затем выдерживают при температуре 6°C в течение 16 ч. Лунки планшета трижды отмывают ФБР, дополнительно содержащим 0,05% Твин-20 (ФБР-Тв). Вносят в лунки по 300 мкл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина в ФБР (1% БСА) и инкубируют при температуре 37°C в течение 60 мин. Три раза промывают лунки ФБР-Тв и вносят супернатант культуральной жидкости в объеме 100 мкл, при необходимости делая разведения в 1% БСА. Планшет инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа. После этого лунки планшета трижды промывают раствором ФБР-Тв и добавляют по 100 мкл раствора конъюгата антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена (Sigma, США) в рабочем разведении 1/3500. Планшет инкубируют при температуре 37°C в

течение 60 минут, затем 5 раз промывают лунки раствором ФБР-Тв. Положительную реакцию оценивают по развитию голубого окрашивания при добавлении хромогенного раствора субстрата ТМБ (состав - 4 мкл 30% H_2O_2 , 4 мг 3,3',5,5-тетраметилбензидина на 100 мл 0,1 М натрий нитратного буфера pH 5,0). Реакцию останавливают добавлением в лунки по 100 мкл 5% H_3PO_4 . Измеряют оптическую плотность OD при длине волны $\lambda=450$ нм. Строят калибровочный график $\text{OD}_{450}=f(\ln C)$ в диапазоне линейной чувствительности, и определяют титр антител. Для определения зависимости связывания антител от присутствия ионов кальция проводят два параллельных определения титра, используя вместо ФБР растворы 2 мМ CaCl_2 в буферизованном растворе Трис (ТБР; состав - 20 мМ Трис - HCl ; 150 мМ NaCl , pH 7,5) и 2 мМ ЭДТА- Na в буферизованном растворе ТБР.

Слияние выделенной первичной культуры спленоцитов выбранного животного с максимальным титром антител к протеину С и клеток миеломы Sp2/0-Ag14 было произведено через 3 дня после последней бустерной инъекции. Последующее культивирование гибридом в течение 8 дней на среде НАТ привело к образованию 350 отдельных лунок, содержащих пулы иммортализованных клеток.

По результатам прямого ИФА супернатантов полученных пулов гибридом часть результатов которого представлена на фигуре 1, было получено обычное бимодальное распределение титра антител. Максимальный сигнал в ИФА составил $\text{OD}_{450}=3,304$, 6 образцов имели сигнал $\text{OD}_{450}>2,0$, верхний 5% процентиль покрывает диапазон активности $\text{OD}_{450}=3,304-0,150$. Для масштабирования было отобрано 48 колоний (лунок) с сигналом ИФА $\text{OD}_{450}>0,100$.

Отобранные для масштабирования 48 поликлональных пулов в течение следующих 10 дней были масштабированы до культивационного объема 5 мл. Масштабированные до объема 5 мл культуры были оттестированы на секрецию кальций-зависимых антител в двух последовательных ИФА с интервалом между отбором супернатантов 48 часов. Результаты представлены в Таблице 1.

Для дальнейшего клонирования были отобраны 4 масштабированные лунки с максимальным сигналом на ИФА. При этом во всех четырех лунках наблюдалось присутствие смеси кальций-зависимых и кальций-независимых антител - сигнал при проведении ИФА в присутствии ЭДТА уменьшался на 12-61%. Это указывает на наличие в пулах клеток существенной доли гибридом, продуцирующих кальций-зависимые антитела и существенно меньшей доли (или полного отсутствия) гибридом, продуцирующих антитела, блокирующиеся ионами кальция.

Пример 2. Клонирование и селекция гибридом, секретирующих кальций-зависимые моноклональные антитела

Клонирование

Клонирование гибридных клеток проводят методом серийных разведений по обоим осям 96-луночных планшетов на слое перитонеальных макрофагов в количестве около 1×10^4 клеток на лунку. Расчетное разведение гибридом - 1 клонообразующая клетка на лунку в длинных диагоналях планшетов достигается при посевной дозе 8 тыс. клеток в 200 мкл в стартовой лунке. Культивирование клонов гибридомы ведут при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Средой культивирования является среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 8 мкг/мл тилозина. Клоны гибридомы криоконсервируют на среде замораживания, состоящей из эмбриональной телячьей сыворотки - 90%, диметилсульфоксида - 10%. Криодепонированные клоны гибридомы хранят в жидком азоте.

Скрининг клонов.

Выбранные по методике, описанной в примере 1, клеточные пулы с максимальной активностью были клонированы в предельных разведениях в пяти 96-луночных планшетах каждый. Через 8 дней было обнаружено 23 лунки, содержащие одиночные круглые колонии клеток. Колонии были пересажены в лунки 24-луночного планшета в культивационном объеме 1 мл.

Через 15 дней после начала клонирования при прямом ИФА тестировании супернатантов было обнаружено 2 клона, секретирующих кальций-зависимые антитела к протеину С человека (сигнал при ИФА с 2 мМ Ca^{2+} $\text{OD}_{450}=2,41$ и $\text{OD}_{450}=1,7$; отношение сигнала при ИФА с 2 мМ EDTA к сигналу в ИФА с 2 мМ Ca^{2+} 2,2% и 19,2%), а также 2 клона, продуцирующих либо смесь антител, либо антитела с частичной кальций-зависимостью (сигнал в ИФА с 2 мМ Ca^{2+} $\text{OD}_{450}=0,58$ и $\text{OD}_{450}=0,41$; отношение сигнала 27,6% и 27%). Данные иммуноферментного анализа клонов приведены в таблице 2.

Отобранные моноклоны были масштабированы до объема 5 мл, криодепонированы и повторно клонированы для разделения возможных олигоклональных колоний методом серийных разведений в пять 96-луночных планшетах каждый.

Через 8 дней после второго клонирования было обнаружено суммарно 12 лунок с единичными округлыми колониями, содержащими моноклоны второго поколения. Моноклоны были масштабированы до культивационного объема 10 мл, при этом 7 клонов из 12 сохранили жизнеспособность.

Через 24 дня после второго клонирования было проведено прямое ИФА тестирование. Был обнаружен 1 клон второй генерации, продуцирующий с высоким титром кальций-зависимые антитела (сигнал $\text{OD}_{450}=1,739$; отношение сигналов 4,9%). Остальные жизнеспособные клоны секретируют кальций-независимые антитела к протеину С человека (сигнал $\text{OD}_{450}=2,165$ - $1,571$, отношение сигналов $>88\%$). Данные иммуноферментного анализа представлены в таблице 3.

Масштабированные клоны гибридом второй генерации были криодепонированы, выживаемость после разморозки составила не менее 60%.

Пример 3. Чувствительность отобранных МКА в твердофазном иммуноферментном анализе.

Для проведения твердофазного ИФА в лунки 96-луночного полистиролового планшета для иммуноферментного анализа вносят по 100 мкл раствора рекомбинантного протеина С в ФБР с содержанием протеина С от 128 нг до 0,5 нг на лунку. Раствор инкубируют в лунках при температуре 4°C в течение 16 часов. Последующие стадии анализа проводят аналогично стадиям, описанным для скрининга гибридных клонов. Моноклональные антитела вносят в лунки в концентрации 100 нг/мл. Отрицательный контроль - сыворотка intactной мыши в разведении 1/1000.

В непрямом твердофазном ИФА моноклональные антитела гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 специфически взаимодействуют с протеином С и определяют до 16 нг белка в анализируемом образце (фигура 2).

Пример 4. Подтверждение специфичности целевых МКА иммуноблоттингом протеина С человека.

Для проверки специфичности МКА гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 к протеину С человека проводят электрофорез по Лэммли в 10% полиакриламидном

геле (ПААГ) в течение 2 часов при 180 В, 20 мА в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Источником антигена является 300-кратный концентрат бессывороточной культуральной среды, кондиционированной в течение 4 суток на клеточной линии DG-CID-PROC-1- продуценте протеина С человека, положительный контроль - очищенный активированный протеин С, отрицательный контроль - 300-кратный концентрат бессывороточной культуральной среды кондиционированной клеточной линией CHO DG 44 (родительской для линии DG-CID-PROC-1, не содержащей трансгенов). Образцы кондиционированной среды наносят в количестве 10 мкг общего белка на дорожку, положительный контроль - 100 нг белка на дорожку. Каждый из образцов наносят в две дорожки, на правой и на левой половинах геля, в центральную дорожку наносят предокрашенный маркер молекулярных масс. После окончания электрофоретического разделения белки переносят из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE LifeSciences, США) в течение 2 часов при силе тока 70 мА при помощи аппарата для полусухого переноса. После завершения переноса мембрану блокируют в 1% растворе БСА в трис-буферизованном растворе (ТБР, состав: 20 мМ трис-НСl, рН 7,4, 150 мМ NaCl) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для промывок мембран и разведения растворов антител используют ТБР, дополнительно содержащий 0,5% Твин 20 (ТБР-Тв). Разрезают мембрану на 2 половины посередине центральной дорожки, содержащей полосы белков из предокрашенного маркера. Каждую половину инкубируют течение 1 часа при температуре 37°C в растворе МКА гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 с концентрацией 1 мкг/мл или в растворе поликлональных антител H00005624-B01 (AbNova, Германия) в рекомендуемом производителем антител разведении. После трехкратной промывки раствором ТБР-Тв мембраны объединяют и инкубируют с раствором антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США), разведение 1/5000. После этого мембраны 5 раз промывают раствором ТБР-Тв и наносят раствор люминисцентного субстрата (2,5 мМ кумаровой кислоты, 1,2% диметилсульфоксида, 1,25 мМ люминола, 0,1М Трис - HCl, рН 8.5), заворачивают в полиэтиленовую пленку и делают отпечатки на фотопленке для рентгенографии с выдержками в диапазоне от 1 до 20 минут.

Было установлено, что МКА, продуцируемые гибридомой Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 дают одну полосу взаимодействия с очищенным активированным протеином С, одну полосу взаимодействия с интактным рекомбинантным протеином С в составе кондиционированной культуральной среды и не дают полос взаимодействия с белками контрольной кондиционированной культуральной смеси. Положение и относительная яркость полос сходны для исследуемых МКА и контрольных поликлональных антител к протеину С.

Моноклональные антитела штамма гибридомы Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 специфичны к протеину С человека.

Пример 5. Получение иммуносорбента на основе МКА 15/A3 и определение его основных свойств

Для исследуемого МКА Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 проводили отделение глобулиновой фракции, аффинную хроматографическую очистку при помощи протеин G-сефарозы и обессоливание диализом. Для этого культуральную жидкость (72 ч культивирования) смешивали с насыщенным раствором сульфата аммония до 50% насыщения. Суспензию перемешивали и выдерживали 2 ч при температуре 4°C, а затем центрифугировали при 14500 м⁻¹ в течение 20 мин. Удаляли

супернатант, осадок растворяли в ФБР, 1/8 начального объема, отделяли осадок денатурированных белков повторным центрифугированием. Полученный супернатант повторно осаждали сульфатом аммония при насыщении 50%, осаждение-растворение повторяли дважды.

Хроматографическую очистку проводили при помощи колонки объемом 1 мл HiTrap Protein G (GE LifeSciences, США) по протоколу производителя. Для удаления аминокислотных соединений нейтрализованный Трис-основанием элюат с колонки концентрировали при помощи ультрафильтрации в центрифужных пробирках Vivaspin 10 кДа (Сарториус Стедим, Германия) до объема 750 мкл, концентрат диализовали против ФБР на мембране с отсеком по седиментационной массе 7000 Да в течение 24 ч при температуре 4°C. Был получен препарат очищенного МКА с концентрацией белка в растворе 310 мкг/мл, объем образца 750 мкл. Степень концентрирования относительно исходной среды составила 400х.

Для иммобилизации очищенного МКА Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 использовали сорбент с амино-реактивными привитыми группами N-гидроксисукцинимидом NHS-activated Sepharose 4 FF (GE LifeSciences, США), процедуру иммобилизации проводили по протоколу производителя сорбента, используя соотношение 200 мкг белка на 1 мл сорбента. Доля иммобилизованных антител после инкубации раствора антител с сорбентом в течение 4 ч при комнатной температуре составила более 90% по данным измерения концентрации белка в растворе. Сорбент упаковывали в хроматографическую колонку объемом 1 мл и проводили инактивацию остаточных N-гидроксисукцинимидных групп пропусканием раствора 0,1 М Трис-HCl pH 8,0 в течение 10 мин. Проводили элюцию нековалентно адсорбированных антител последовательными промывками растворами 0,1 М ацетата натрия, 0,5 М NaCl, pH 4 и 0,1 М этаноламина, pH 8,5. Колонку промывали 20% этанолом до полного удаления солей и хранили при температуре +4°C.

Для определения рабочих свойств полученного иммуносорбента проводили адсорбцию рекомбинантного протеина С из нефракционированной кондиционированной среды и последующую элюцию. Для этого к 10 мл кондиционированной культуральной среды, содержащей около 2 мкг/мл рекомбинантного протеина С по данным ИФА, добавляли CaCl₂ до конечной концентрации 20 мМ. Колонку с иммуносорбентом уравнивали раствором 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 20 мМ CaCl₂. Наносили на колонку 10 мл подготовленной среды на скорости 0,1 мл/мин (время контакта - 10 мин), фракцию проскока собирали. Концентрация протеина С в проскоке составила менее 0,1 мкг/мл по данным ИФА. После нанесения образца колонку промывали 20 мл раствора 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 1 М NaCl, 20 мМ CaCl₂ на скорости 1 мл/мин и проводили элюцию протеина С раствором 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 20 мМ Na-ЭДТА, 0,1% Твин-80. Было собрано 2,2 мл раствора элюированного белка, содержащего суммарно 12 мкг протеина С по данным ИФА. Таким образом, емкость полученного сорбента составила не менее 50 мкг целевого белка на 1 мг иммобилизованных антител, при этом чистота целевого белка после элюции составляла более 90% по данным денситометрии ДСН-ПААГ, при исходной доле целевого белка менее 2% от общего белка, измеренного по Брэдфорд.

Эти свойства клонального штамма Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3, а также взаимодействие его МКА с протеином С человека свидетельствует о возможности использования заявляемых МКА в качестве лиганда для получения иммуносорбента.

Таблица 1. Ранжированная активность поликлональных пулов гибридом в тесте ИФА с повторным измерением

Адрес пула	Оптическая плотность 450 нм, ОЕ		Но- вый №	Адрес пула	Оптическая плотность 450 нм, ОЕ; повторный тест +48 ч			
	Промывочный раствор содержит				Отнош ение	Промывочный раствор содержит		Отнош ение
	2 мМ Ca ²⁺	2 мМ ЭДТА				2 мМ Ca ²⁺	2 мМ ЭДТА	
14 G10	2,647	1,38	52%	1	14 G10	2,115	1,859	88%
24 C8	2,139	0,969	45%	2	24 C8	1,937	0,946	49%
23 b5	2,093	0,832	40%	3	23 b5	1,532	1,153	75%
2,1 6	0,198	0,087	44%	4	2,1 6	0,257	0,101	39%

Таблица 2. Ранжированная по величине сигнала на ИФА активность первых клонов гибридом

Пул №	Адрес	Оптическая плотность 450 нм, ОЕ		
		Промывочный раствор содержит		Отношение
		2 мМ Ca ²⁺	2 мМ ЭДТА	
Кальций-зависимые клоны				
3	10/C8	2,411	0,054	2,2%
2	2/H7	1,707	0,328	19,2%
Кальций-независимые клоны				
2	2/26	3,690	2,238	60,7%
3	2/13	3,615	2,656	73,5%
4	4/G7	3,219	2,588	80,4%
1	1/D2	2,918	2,522	86,4%
3	3/H6	2,834	2,561	90,4%
Переменная активность кандидатные клоны				
2	2NS	0,583	0,161	27,6%
2	2/F1	0,410	0,111	27,0%

Таблица 3. Активность конечных масштабированных клонов гибридом по ИФА

Конечный №	Клон 1го поколения	Конечный клон	Оптическая плотность 450 нм, ОЕ		Отноше- ние
			Промывочный раствор содержит		
			2 мМ Са ²⁺	2 мМ ЭДТА	
Кальций-зависимые клоны					
1	10/C8	15/A3	1,739	0,085	4,9%
отбракован	2/H7	1/D9	0,092	0,083	90,2%
Кальций-независимые клоны					
2	2/13	1/C6	2,165	2,148	99,2%
3	2/26	4/F10	2,216	1,968	88,8%
4	2/13	2/F8	2,009	1,944	96,8%
5	3/H6	5/D7	1,649	1,577	95,6%
6	2/13	4/B12	1.571	1.402	89.2%

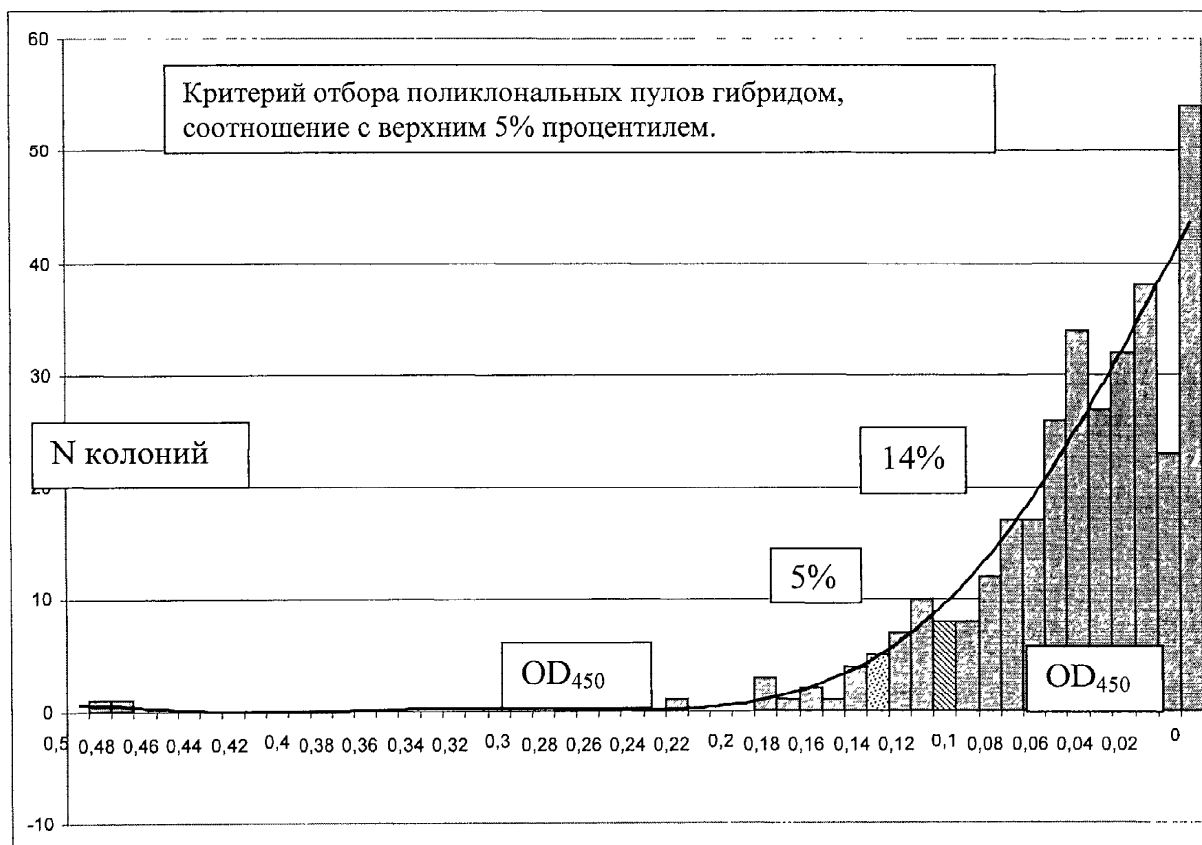
Формула изобретения

1. Штамм гибридных культивируемых клеток животных Mus musculus Sp2/0Ag14-SpBcG/APC-15/A3 - продуцент моноклональных антител, специфичных к протеину С человека, связывающих антиген в присутствии ионов кальция и не связывающих в присутствии хелатирующих агентов, депонированный в Российской Коллекции

Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН, регистрационный номер №733 (Д).

2. Моноклональное антитело, специфичное к протеину С человека, связывающее антиген в присутствии ионов кальция и не связывающее его в присутствии хелатирующих агентов, полученное путем культивирования в питательной среде штамма по п.1 и выделения его из культуральной жидкости.

3. Иммуносорбент для сорбции протеина С человека, содержащий ковалентно связанное с ним моноклональное антитело по п.2.



Фиг. 1