



(19) **UA** (11) **75 393** (13) **C2**
 (51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
 УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
 ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2003108989, 08.04.2002

(24) Дата начала действия патента: 17.04.2006

(30) Приоритет: 06.04.2001 CU 84/2001

(46) Дата публикации: 15.04.2006С07К 16/30
 20060101АFI20060101RHUA С07К
 16/46 20060101СLI20060101RHUA
 А61К 39/395
 20060101СLI20060101RHUA А61Р
 35/00 20060101СLI20060101RHUA

(86) Заявка РСТ:
 РСТ/CU02/00003, 20020408

(72) Изобретатель:

Матео Де Акоста Дель Рио Кристина Мария,
 СУ,
 Ломбардеро Валладарес Хосефа, СУ,
 Роке Наварро Лурдес Татиана, СУ,
 Лопес Рекена Алехандро, СУ

(73) Патентовладелец:

ЦЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИЯ МОЛЕКУЛАР, СУ

(54) ХИМЕРНОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, КОТОРОЕ РАСПОЗНАЕТ ГАНГЛИОЗИДЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ N-ГЛИКОЛИЛИРОВАННУЮ СИАЛОВУЮ КИСЛОТУ, ЛИНИЯ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩАЯ ИХ, И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО

(57) Реферат:

Изобретение относится к получению генно-инженерных антител из мышиног моноклонального антитела Р3 (MAb Р3), которое продуцируется гибридомой, депонируемой в ЕСАСС под № 94113026, согласно Будапештскому договору, с целью получения антител, которые имеют такие же опознавательные свойства, что и исходное антитело, но являются менее иммуногенными. Химерное антитело включает переменные домены мышиног иммуноглобулина и константные участки человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, кроме того, что оно включает константные участки человеческого

иммуноглобулина, модифицируется на участке мышинных каркасных участков (FRs) и, в частности, на тех участках, которые могут быть преобразованы на сайт детерминанты Т-клеток, в результате чего некоторые положения каркасных участков являются человеческими. Упомянутые антитела могут использоваться для диагностики и терапии опухолей разных типов.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 4, 15.04.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2



(19) **UA** (11) **75 393** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2003108989, 08.04.2002

(24) Effective date for property rights: 17.04.2006

(30) Priority: 06.04.2001 CU 84/2001

(46) Publication date: 15.04.2006C07K 16/30
20060101AFI20060101RHUA C07K
16/46 20060101CLI20060101RHUA
A61K 39/395
20060101CLI20060101RHUA A61P
35/00 20060101CLI20060101RHUA

(86) PCT application:
PCT/CU02/00003, 20020408

(72) Inventor:

Mateo De Acosta Del Rio Christina Maria, CU,
Lombardero Valladares Josefa, CU,
Roke Navarro Lurdes Tatiana, CU,
Lopes Rekena Alejandro, CU

(73) Proprietor:

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, CU

(54) CHIMERIC MONOCLONAL ANTIBODY, IDENTIFYING GANGLIOSIDES CONTAINING N-GLYCOLYL SIALIC ACID, CELLS LINE PRODUCING IT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING IT

(57) Abstract:

The invention relates to the obtaining genetically-engineered antibodies from the P3 (AcM P3) murine monoclonal antibody, which is produced by the hybridoma deposited under number ECACC 94113026 in accordance with the Budapest treaty, with the purpose of obtaining antibodies which have the same recognition properties as the original but which is less immunogenic. The chimeric antibody contain the variable domains of murine immunoglobulin and the constant regions of human immunoglobulin. The humanized antibody, in addition to containing the constant regions of

human immunoglobulin, is modified in the murine frameworks (FRs) region and, in particular, in those areas that can be converted into a T-cell antigenic site, as a result of which some FRS positions are human. Said antibodies can be used for the diagnosis and therapy of different types of tumors.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 4, 15.04.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2



(19) **UA** (11) **75 393** (13) **C2**
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2003108989, 08.04.2002

(24) Дата набуття чинності: 17.04.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 06.04.2001 CU 84/2001

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.04.2006C07K 16/30
20060101AFI20060101RHUA C07K
16/46 20060101CLI20060101RHUA
A61K 39/395
20060101CLI20060101RHUA A61P
35/00 20060101CLI20060101RHUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/CU02/00003, 20020408

(72) Винахідник(и):

Матео Де Акоста Дель Ріо Крістіна Марія, CU,
Ломбардеро Валладарес Хосефа, CU,
Роке Наварро Лурдес Татіана, CU,
Лопес Рекена Алехандро, CU

(73) Власник(и):

ЦЕНТРО ДЕ ІМУНОЛОГІЯ МОЛЕКУЛАР, CU

(54) ХИМЕРНЕ МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЩО РОЗПІЗНАЄ ГАНГЛІОЗИДИ, ЯКІ ВКЛЮЧАЮТЬ N-ГЛІКОЛІЛЬОВАНУ СІЛЛОВУ КИСЛОТУ, ЛІНІЯ КЛІТИН, ЯКА ЙОГО ПРОДУКУЄ, ТА ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО ЙОГО МІСТЯТЬ

(57) Реферат:

Винахід належить до одержання генно-інженерних антитіл із мишачого моноклонального антитіла P3 (MAb P3), що продукується гібридомою, депонованою у ЕСАСС під № 94113026, згідно з Будапештським договором, з метою одержання антитіл, які мають такі самі розпізнавальні властивості, що і вихідне антитіло, але є менш імуногенними. Химерне антитіло включає варіабельні домени мишачого імуноглобуліну та константні ділянки

людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло, окрім того, що воно включає константні ділянки людського імуноглобуліну, модифікується на ділянці мишачих каркасних ділянок (FRs) і, зокрема, на тих ділянках, які можуть бути перетворені на сайт детермінанти Т-клітин, унаслідок чого деякі положення каркасних ділянок є людськими. Згадані антитіла можуть використовуватись для діагностики та терапії пухлин різних типів.

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2

Опис винаходу

Цей винахід має відношення до біотехнології, зокрема, до нових рекомбінантних антитіл, які одержують шляхом генної інженерії, зокрема, до химерних та гуманізованих антитіл, які одержують із мишачого моноклонального антитіла P3 (MAb P3) та його антиїдіотипового мишачого моноклонального антитіла 1E10 (MAb 1E10).

Зокрема, цей винахід має відношення до антитіл, які зв'язуються з гангліозидами, що включають N-гліколілльовану сіалову кислоту, але не з ацетильованими формами гангліозидів, а також не з нейтральними гліколіпідами. Гангліозиди, що включають N-гліколілльовану сіалову кислоту, є антигенами, які широко експресуються раковими пухлинами молочної залози та меланомами. З іншого боку, протипухлинний ефект MAb 1E 10 демонстрували також на експериментальних моделях.

Цей винахід має також відношення до фармацевтичних композицій, що включають рекомбінантні антитіла, опис яких наводили раніше, придатних для діагностування та лікування раку, зокрема, раку молочної залози та меланом.

Гангліозиди є глікофінголіпідами, що включають сіалову кислоту і входять до складу плазматичної мембрани клітин хребетних [Стултс (Stults) та інші (1989): *Glycosphingolipids: structure, biological source and properties, Methods Enzymology*, 179:167-214]. У літературі повідомлялось, що деякі з цих молекул є антигенами, асоційованими з пухлинами або пухлинними маркерами [Хакоморі (Hakomori) та інші (1991): *Possible functions of tumor associated carbohydrate antigens, Curr. Opin. Immunol.*, 3:646-653]. З цього приводу застосування антигангліозидних антитіл описують, як придатне у діагностиці та терапії раку [Хафтон (Houghton) та інші (1985): *Mouse monoclonal antibody IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: to phase I trial in patients with malignant melanoma, PNAS USA*, 82:1242-1246; Жанг (Zhang) та інші (1997): *Selection of carbohydrate tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry. I. Focus on gangliosides, Int. J. Cancer*, 73:42-49].

Сіаловими кислотами, що частіше експресуються тваринами, є N-ацетилнейрамінова (NeuAc) та N-гліколілльована нейрамінова (NeuGc) кислоти [Корфілд (Corfield) та інші (1982): *Occurrence of sialic acids, Cell. Biol. Monogr.*, 10:5-50]. NeuGc не експресується нормальними людськими та курячими тканинами взагалі, однак вона є широко розповсюдженою серед інших хребетних [Ліден (Leeden) та Ю (Yu) (1976): *Chemistry and analysis of sialic acid. У: Biological Role of Sialic Acid. Роземберг А. (Rosemberg A.) та Шенгтранд Кп. (Shengtrund Cl.) (Редактори) Plenum Press, New York, 1-48; Кавай (Kawai) та інші (1991): Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry, Cancer Research*, 51:1242-1246]. Існують, однак, повідомлення, які показують, що анти-NeuGc антитіла розпізнають деякі людські пухлини та лінії пухлинних клітин [Хігаші (Higashi) та інші (1988): *Detection of gangliosides as N-glycolylneuraminic acid specific tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human retinoblastoma cells, Jpn. J. Cancer Res.*, 79:952-956; Фукуї (Fukui) та інші (1989): *Detection of glycoproteins as tumor associated Hanganutziu-Deicher antigen in human gastric cancer cell line, NUGC4, Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 1149-1154]. Підвищені рівні GM3 (NeuGc) гангліозидів були виявлені у ракових пухлинах людської молочної залози [Маркіна (Marquina) та інші (1996): *Gangliosides expressed in human breast cancer, Cancer Research*, 1996; 56: 5165-5171]. Такий результат робить привабливим застосування цієї молекули як мішені для лікування раку.

Моноклональне антитіло (MAb) P3 продукується лінією клітин, депонованою у ECACC (Європейська колекція культивованих клітин тварин) під №94113026 [європейський патент EP 0657471 B1]. Це мишаче моноклональне антитіло з ізотипом IgM, яке одержали шляхом злиття мишачих спленоцитів мишей лінії BALB/c, імунізованих ліпосомами, що включають GM3 (NeuGc) та правцевий анатоксин, із клітинами лінії P3-X63-Ag8.653, які представляють собою лінію клітин мишачої мієломи. Це MAb P3 активно реагує з гангліозидами, що містять N-гліколілльовану сіалову кислоту, і не реагують ні з ацетильованими формами гангліозидів, ні з нейтральними гліколіпідами. Дані імуноцитохімічних та імуногістохімічних досліджень, проведених із лініями клітин та тканинами злоякісних та неопластичних пухлин, продемонстрували, що MAb P3 розпізнає рак молочної залози [Васкес (Vazquez) та інші (1995): *Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids, Hybridoma*, 14:551-556] та меланому.

MAb P3 індукує антиїдіотипову імунну відповідь (Ab2) у мишей лінії BALB/c (сингенна модель) навіть без ад'юванту та білка-носія [Васкес (Vazquez) та інші (1998): *Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody, Hybridoma*, 17:527-534]. Роль електронегативних груп, сіалової кислоти (для гангліозидів) та SO_3^- (для сульфатидів), у розпізнавальних властивостях цього антитіла була встановлена шляхом імунохімічного аналізу [Морено (Moreno) та інші (1998): *Delineation of epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides, Glycobiology*, 8:695-705].

Антиїдіотипове MAb 1E10 (MAb 1E10) підтипу IgG1 одержали від мишей лінії BALB/c, імунізованих MAb P3, сполученим із KLH (гемоціанін лімфи равлика) [патент США №6,063,379, лінія клітини, депонована у ECACC під №97112901]. MAb 1E10 розпізнає конкретно MAb P3 і не зв'язує інші IgM антигангліозидні антитіла. Більше того, MAb 1E10 пригнічує специфічне зв'язування MAb P3 з GM3 (NeuGc) і з лінією клітин MDA-MB-435, яку одержали з ракової пухлини протоки молочної залози (позитивна на зв'язування MAb P3). MAb 1E10 індукує активну імунну відповідь (антитіла Ab3) у разі імунізації мишей сингенних або алогенних моделей; ці антитіла

Ab3 не демонструють тієї саме специфічності, що MAb P3, навіть у тому разі, коли вони несуть набори ідіотипових детермінант, подібні до тих, що переносяться антитілом Ab1 [Васкес (Vazquez) та інші (1998): Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody, Hybridoma, 17:527-534]. MAbai 1E10 індукує сильний протипухлинний ефект як у сингенних, так і у алогенних мишей. Ріст лінії клітин F3II карциноми молочної залози був значно уповільнений повторною дозою MAbai 1E10, сполученого з KLN, у ад'юванті Фрейнда у разі імунізації мишей лінії BALB/c. Крім того, після імунізації зменшилась кількість спонтанних легеневих метастаз. Інтравенозне введення MAbai 1E10 мишам лінії C57BL/6 через 10-14 днів після інтравенозного введення останнім клітин меланоми B16, викликало різке зменшення кількості легеневих метастаз, порівняно з мишами, які одержували сторонній IgG. Ці результати дозволяють зробити припущення про те, що відбувається запуск більш ніж одного механізму протипухлинного ефекту [Васкес (Vazquez) та інші (2000): Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides, Oncol. Rep., 7:751-756, 2000].

Незважаючи на те, що технологія моноклональних антитіл розробляється впродовж останніх 15 років [Келер (Koebler) та Мілстайн (Milstein) (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256: 495-497], а також на те, що моноклональні антитіла все ще залишаються дуже корисними у діагностиці та дослідженнях, вони не продемонстрували своєї терапевтичної ефективності на людях. Це обумовлюється, головним чином, їх нетривалим часом напівжиття у крові, тим, що мишачі ефекторні функції виявились непридатними для людської імунної системи, а також людською імунною відповіддю, що полягає у продукуванні антимишачих антитіл.

Окрім того, генно-інженерна технологія революціонізувала потенціал придатності моноклональних антитіл, оскільки завдяки маніпулюванню імуноглобуліновими генами можна одержати модифіковані антитіла послабленої антигенності, а також поліпшити їх ефекторні функції для лікування або діагностування певних патологій. Головна мета способів послаблення імуногенності імуноглобулінів полягає у зменшенні різниць між мишачим антитілом та людським імуноглобуліном, без зміни антигенної розпізнавальної специфічності [Моррісон (Morrison) та Уї (O'i) (1989): Genetically engineered antibody molecules, Adv. Immunol., 44:65-92].

Нещодавно було розроблено декілька способів гуманізації мишачих або щурячих антитіл і, таким чином, послаблення ксеногенної імунної відповіді проти чужорідних білків, у разі їх введення людям. Одним із перших варіантів підходу до послаблення антигенних властивостей були химерні антитіла, у яких варіабельні домени мишачого білка вставляють до константних доменів людських молекул, що демонструють таку саме специфічність, але послаблену імуногенність, порівняно з їх мишачими двійниками, причому химерні антитіла зберігають людські ефекторні функції [Моррісон (Morrison) та інші (1984): Chimeric human antibody molecules: Mouse antigenbinding domains with human constant region domains, PNAS USA, 81:6851-6855]. Навіть у тому разі, коли химерні антитіла мають таку саме специфічність, що і мишачі двійники, на варіабельні ділянки гризунів часто спостерігається імунна відповідь.

З метою додаткового послаблення імуногенності химерних антитіл, до людських основних ділянок трансплантували лише гіперваріабельні ділянки моноклонального антитіла гризунів і ця гібридна варіабельна ділянка експресувалась разом із людськими константними ділянками [Джонс (Jones) та інші (1986): Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse, Nature 321:522-524; Верхейєн (Verhoeyen) та інші (1988): Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity, Science 239, 1534-1536]. Цей варіант підходу, однак, має декілька недоліків: головний з них полягає у тому, що одержане антитіло втрачає афінність, порівняно з мишачим двійником, унаслідок чого деякі залишки основних ділянок необхідно відновлювати відповідниками у мишачому імуноглобуліні [Річман (Rietchmann) та інші (1988): Reshaping human antibodies for therapy, Nature, 332: 323-327; Куїн (Queen) та інші (1989): A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, PNAS USA, 86:10029-10033; Темпест (Tempest) та інші (1991): Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo, Biotechnology, 9:266-272]. На додаток до цього, у антитіл із трансплантованими гіперваріабельними ділянками часто спостерігається стійка імуногенність.

Матео (Mateo) та співробітники [патент США №5712120] навели опис і способу послаблення імуногенності мишачих антитіл. За цим способом модифікації обмежуються варіабельними доменами і, конкретно, мишачими основними ділянками химерних антитіл. Більше того, заміни здійснюються лише на тих частинах основних ділянок, які мають амфіпатичні послідовності, і, таким чином, є потенційними антигенними детермінантами, що розпізнаються Т-клітинами. Згаданий спосіб включає розважливу заміну декількох амінокислотних залишків, розміщених у потенційно імуногенних антигенних детермінантах, відповідними залишками найгомологічнішої людської послідовності; подібній заміні не підлягають амінокислоти, які, головним чином, несуть відповідальність за канонічні структури, а також залишки, що знаходяться у безпосередній близькості до гіперваріабельних ділянок або у зоні Верн'є.

Одержане антитіло зберігає свою антиген-зв'язувальну специфічність і є менш імуногенним, ніж його мишачий або химерний попередник [Матео (Mateo) та інші (2000): Removal of T cell epitopes from genetically engineered antibodies: Production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity, Hybridoma 19:463-71]; ці властивості підвищують їх терапевтичну придатність. За цим способом необхідно здійснювати лише нечисленні мутації та вдаватися, звичайно, до меншого обсягу генетичних маніпуляцій.

Цей винахід має відношення до рекомбінантних антитіл, одержаних засобами генної інженерії. Зокрема, цей винахід має відношення до химерного антитіла, що одержують із мишачого моноклонального антитіла P3, яке продукується лінією клітин гібридами, депонованою у ECACC під №94113026. MAb P3 розпізнає антиген, що експресується клітинами пухлини молочної залози та меланомами. MAb P3 відрізняється такими

послідовностями гіперваріабельних ділянок (CDRs) важкого та легкого ланцюгів:

Важкий ланцюг:

CDR1: RYSVH

CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS

CDR3: SGVREGRAQAWFAY

Легкий ланцюг:

CDR1: KASQDVSTAVA

CDR2: SASRYT CDR3: QQHYSTPWT

За варіантом, якому віддається перевага, послідовності остовних ділянок важкого та легкого ланцюга є такими:

Важкий ланцюг:

FR1: QVQLKESGPGVLVAPSQSL SITCTVSGFSL

FR2: WVRQPPGKGLEWLG

FR3: RLSISKDNSKSKVFLKMNSLQTDDTAMYFCAR

FR4: WGQGTLV

Легкий ланцюг:

FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

FR2: WYQQKPGQSPKLLIY

FR3: GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYC

FR4: FGGGTKL

За варіантом, якому віддається перевага, химерне антитіло за цим винаходом включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG1 і константну ділянку легкого ланцюга людського Ск. За іншим аспектом, цей винахід має відношення до гуманізованого антитіла, яке одержують із MAb P3, що продукується лінією клітин гібридоми, депонованою у ECACC під №94113026, що відрізняється тим, що включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG1 та константну ділянку легкого ланцюга людського Ск і остовні ділянки легкого ланцюга включають будь-яку з наведених далі точкових мутацій:

Легкий ланцюг:

Положення 8: His на Pro

Положення 9: Lys на Ser

Положення 10: Phe на Ser

Положення 11: Met на Leu

Положення 13: Thr на Ala

За іншим аспектом, цей винахід має відношення до химерного антитіла, яке одержують із мишачого моноклонального антитіла 1E10, що продукується лінією клітин гібридоми, депонованою у ECACC під №97112901, і яке є антиідіотиповим антитілом, що розпізнає MAb P3. MAbai 1E10 відрізняється такими послідовностями гіперваріабельних ділянок (CDR) важкого та легкого ланцюгів:

Важкий Ланцюг:

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDCSTKYNEKFKG

CDR3: EDYYDNSYFFDY

Легкий ланцюг:

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

За варіантом, якому віддається перевага, послідовності остовних ділянок важкого та легкого ланцюга є такими:

Важкий ланцюг:

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

FR4: WGQGTTLTV

Легкий ланцюг:

FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

FR4: FGGGTKLESK

За варіантом, якому віддається перевага, химерне антитіло за цим винаходом включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG1 і константну ділянку легкого ланцюга людського Ск. За іншим аспектом, цей винахід має відношення до гуманізованого антитіла, яке одержують з MAb 1E10, що продукується лінією клітин гібридоми, депонованою у ECACC під №97112901, що відрізняється тим, що включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG1 та константну ділянку легкого ланцюга людського Ск і остовні ділянки важкого та легкого ланцюга включають будь-яку з наведених далі точкових мутацій:

Легкий ланцюг:

Положення 7: Thr на Ser

Положення 8: Thr на Pro

Положення 15: Leu на Val
Важкий ланцюг:

Положення 5: Gln на Val

Положення 40: Arg на Ala

Положення 42: Glu на Gly

Положення 87 (83 за нумерацією Кабата (Kabat)): Thr на Arg

За іншим аспектом, цей винахід має відношення до ліній клітин, що експресують химерні та гуманізовані антитіла, опис яких наведено; на додаток до цього, винахід має відношення до фармацевтичних композицій, що містять антитіла, опис яких наведено.

За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід має відношення до фармацевтичних композицій для лікування пухлин молочної залози, легень, шлунково-кишкової системи, сечово-статевої системи, меланом, сарком та пухлин нейроектодермічного походження, їхніх метастаз та рецидивів, що містять антитіла, опис яких наведено, та відповідний наповнювач.

За іншим варіантом втілення цього винаходу фармацевтичні композиції можуть застосовуватись для локалізації та діагнозу in vivo пухлин молочної залози, легень, шлунково-кишкової системи, сечово-статевої системи, меланом, сарком та пухлин нейроектодермічного походження, їхніх метастаз та рецидивів, і включати антитіла, опис яких наведено.

Синтез кДНК та ампліфікація засобами полімеразної ланцюгової реакції (PCR) варіабельної ділянки MAb P3 та MAb1 1E10

Цитоплазматичну РНК екстрагували із приблизно 10^6 клітин гібридами P3 (мишаче IgM Mab, що розпізнає GM3 N-гліколілований гангліозид) або 1E10 (антидіотипове анти-P3 антитіло). РНК екстрагували за допомогою реактиву TRIZOL (фірма GIBCO BRL, Grand Island, Нью-Йорк) за інструкціями виробника.

Реакцію синтезу кДНК здійснювали шляхом змішування 5мкг РНК, 25пмоль Vh (комплементарного до константної ділянки мишачого IgM для VHP3 та константної ділянки мишачого IgG1 для VH 1E10) або Vk (комплементарного до константної мишачої каппа-ділянки для обох антитіл), 2,5ММ розчину дезоксинуклеозид-5'-трифосфату (dNTP), 50ММ розчину трис-HCl (рН 7,5), 75ММ розчину KCl, 10ММ розчину дитіотреїтолу (DTT), 8ММ розчину MgCl₂ та 15 одиниць інгібітору РНКаз у 50мкл реакційної суміші. Суміш нагрівали при температурі 70°C впродовж 10хв. і повільно охолоджували до температури 37°C. Після цього додавали 100 одиниць РНК-залежної ДНК-полімерази, і інкубування продовжували при температурі 42 °С впродовж 1год.

Варіабельні ділянки VK та VH кДНК ампліфікували засобами полімеразної ланцюгової реакції. Стисло, 5мкл кДНК VH або VK змішували з 25пмоль специфічного праймера, 2,5ММ розчином dNTP, 5мкл складових буфера 10X Taq-полімерази та 1 одиницею цього ферменту. Зразки піддавали 25 термічним циклам при температурі 94°C, 30с.; 50°C, 30с.; 72°C, 1хв. і, нарешті, інкубуванню впродовж 5хв. при температурі 72°C.

Клонування та секвенування ампліфікованої кДНК

Продукти PCR VH та VK (P3 та 1E10, відповідно) клонували до вектора TA (набір для клонування Ta Cloning kit, фірма Promega, США). Одержані клони секвенували дидезокси методом встановлення первинної структури ДНК із застосуванням T7 ДНК-полімерази (набір для секвенування T7 sequencing kit, фірма Pharmacia, Швеція).

Конструювання химерних генів

Гени варіабельних ділянок важких та легких ланцюгів (VH та VK) вирізували з векторів TA шляхом ферментативного розщеплення і клонували до відповідних векторів експресії [Колома (Coloma) та інші (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, J. Immunol. Meth., 152: 89-104].

Гени VH вирізували з вектора TA шляхом ферментативного розщеплення за допомогою EcoRV та NheI і клонували до вектора експресії (PAN 4604), що включав варіабельну ділянку людського IgG1 і ген стійкості до гістидинолу. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як P3VH-PAN4604 та 1E10VH-PAN4604.

Гени VK вирізували з вектора TA шляхом ферментативного розщеплення за допомогою EcoRV та Sall і клонували до вектора експресії (PAG4622). Цей вектор включав ген стійкості до мікофенолової кислоти та людську константну каппа-ділянку. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як P3VK-PAG4622 та 1E10VK-PAG4622.

Експресія химерних антитіл, одержаних із MAb P3 та MAb1 1E10

Клітини NS-0 піддавали електропорації 10мкг P3VK-PAG4622 або 1E10VK-PAG4622K; клони, що експресували людські легкі каппа-ланцюги, трансфікували 10мкг P3VH-PAN4604 або 1E10VH-PAN4604.

ДНК лінеаризували шляхом розщеплення ферментом PvuI, осаджували етанолом та розчиняли у 50мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину. Приблизно 10^7 клітин збирали шляхом центрифугування і ресуспендували у 0,5мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину разом із розщепленою ДНК у електропораційній кюветі. Після 10хв. на льоду клітини піддавались імпульсу електричного току (200В, 960мкФ) і залишались на льоду додатково впродовж 10хв. Після цього клітини розподіляли до 96-луноквої планшета з модифікованим за способом Дюльбекко живильним середовищем Ігла F12 плюс 10% фетальної телячої сироватки. Через два або чотири дні додавали селективне середовище (модифіковане за способом Дюльбекко живильне середовище Ігла F12 з мікофеноловою кислотою (0,45мкг/мл) або гістидиномом (10ММ розчин), відповідно). Трансфіковані клони спостерігались неозброєним оком через 14 днів.

Присутність людського антитіла у живильному середовищі лунок, що містили трансфіковані клони, визначали шляхом твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA). Лунки титраційного мікропланшета сенсibiliзували

5 козячим антилюдським легким каппа-ланцюгом (для клонів, що продукують людський каппа-ланцюг) або антилюдськими IgG (специфічними для гамма-ланцюга) (для клонів, що продукують повне антитіло) антитілами. Після промивання PBS-T (забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05% Твін-20) розбавлене культуральне середовище лунок, що містять трансфектанти, додавали до кожної лунки титраційного мікропланшета на 1 год при температурі 37°C. Лунки промивали PBS-T, додавали козячий антилюдський легкий каппа-ланцюг, кон'югований із пероксидазою із хрому або козячий антилюдський IgG, кон'югований із лужною фосфатазою (специфічний для гамма-ланцюга), та інкубували при температурі 37 °C впродовж 1 год. Лунки промивали PBS-T і додавали субстратний буфер, що містив о-фенілендіамін або р-нітрофенілфосфат, відповідно. Через півгодини визначали оптичну густину при 492нм або 405нм, відповідно.

10 Конструювання гуманізованих антитіл P3hu та 1E10hu шляхом гуманізації антигенних детермінант Т-клітин. Прогнозування антигенних детермінант Т-клітин

15 Послідовності варіабельних ділянок P3 та 1E10 аналізували за допомогою алгоритму AMPHI [Margalit (Margalit) та інші (1987): Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence, J. Immunol., 138:2213-2229]. За його допомогою розшукують спіральні амфіпатичні сегменти з 7-11 амінокислотними залишками, які асоціюються з Т-імуногенністю. Спіральні гідрофобні сегменти прогнозували також за допомогою програми SONHA [Елліот (Elliot) та інші (1987). An hypothesis on the binding of an amphipatic, alpha helical sequence in li to the desotope of class II antigen, J. Immunol., 138: 2449-2952]. Обидва алгоритми прогнозували, які сегменти з послідовностей варіабельних ділянок антитіл P3 та 1E10 могли б бути презентовані Т-клітинам-помічникам у контексті молекул II класу головного комплексу гістосумісності.

20 Аналіз гомології з людськими імуноглобулінами

25 Амінокислотні послідовності мишачих варіабельних ділянок порівнювали з імуноглобуліновими послідовностями, включеними до бази даних GeneBank та EMBL (доступна у Інтернеті). Для кожного антитіла було визначено найгомологічнішу послідовність людської варіабельної ділянки. Для пошуку гомологічних послідовностей було використано програмне забезпечення PC-TWO HIBЮ PROSIS 06-00 (Hitachi).

Аналіз на послаблення імуногенності

30 Метою способу є послаблення імуногенності шляхом руйнування або гуманізації потенційних імуногенних Т-антигенних детермінант із мінімальною кількістю мутацій. Згаданий спосіб включає розважливу заміну декількох амінокислотних залишків, що знаходяться у межах спіральних амфіпатичних сегментів. Амінокислоти, які несуть, головним чином, відповідальність за канонічні структури, а також залишки у безпосередній близькості до гіперваріабельних ділянок або у зоні Верн'є, повинні зберігатись.

35 За цим способом порівнюють послідовності варіабельних ділянок важких та легких ланцюгів мишачого імуноглобуліну з найгомологічнішими людськими послідовностями з ідентифікуванням залишків, якими різняться мишача та людська послідовності, лише у амфіпатичних сегментів, що знаходяться у межах остовних ділянок [Кабат (Kabat) (1991), Sequences of proteins of immunological interest, п'яте видання, Національний Інститут Здоров'я (США)]. Раніше визначені залишки замінювали залишками, присутніми у найгомологічнішій людській послідовності. Заміни здійснювали методами прямого мутагенезу.

40 Залишки, залучені до тривимірної структури місця зв'язування, мутаціям не піддавали; це могло негативно вплинути на розпізнавання антигену. Додаткову інформацію відносно впливу замін у третинній структурі можна одержати шляхом молекулярного моделювання місця зв'язування антигену.

45 Слід звернути увагу на присутність пролінових залишків у спіральному амфіпатичному сегменті, а також на те, що певні мишачі залишки не з'являються у тому саме положенні у найгомологічнішій людській послідовності, однак часто зустрічаються у інших людських імуноглобулінах. Із цієї причини не існує унікального набору мишачих амінокислот до заміни у основних ділянках. Можна одержати різні варіанти модифікованого антитіла з різною кількістю замін. Мутації здійснювали шляхом перекривання полімеразних ланцюгових реакцій.

Клонування та експресія гуманізованих антитіл P3hu та 1E10hu

50 Генно-інженерні конструкції, що відповідали P3hu та 1E10hu, клонували у векторах експресії за способом, опис якого наведено для химерних антитіл. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як P3VKhu-Pag4622 або 1E10VKhu-PAG4622 та P3VHhu-PAH4604 і 1E10VHhu-PAH4604. Вони були трансфіковані до клітин NS-0 за методикою, опис якої було наведено перед тим для химерних антитіл.

Очищення рекомбінантних антитіл

Рекомбінантні антитіла очищали засобами афінної хроматографії із застосуванням білка А (фірма Pharmacia, Uppsala, Швеція).

Біологічна активність

55 Біологічну активність рекомбінантних антитіл перевіряли за специфічним зв'язуванням з антигеном, що визначали шляхом ELISA.

60 Для рекомбінантного MAб P3, титрувальні мікропланшети сенсibiliзували розчином GM3(NeuGc) гангліозиду у метанолі. Після просушування впродовж 1 год., неспецифічне зв'язування блокували 1% розчином сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (BSA) у трис-HCl та інкубували впродовж 1 год. при температурі 37°C. Лунки промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином та інкубували впродовж 1 год. при температурі 37°C з очищеним рекомбінантним MAб P3. Лунки промивали трис-HCl, додавали козяче антилюдське антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою та інкубували при температурі 37°C впродовж 1 год. І, нарешті, лунки промивали та додавали субстратний буфер, що включав р-нітрофенілфосфат. Через півгодини визначали оптичну густину при 405нм або 492нм, відповідно.

65 Для рекомбінантного MAбi 1E10 ELISA здійснювали подібним же чином, за виключенням того, що лунки сенсibiliзували MAб P3 і промивали PBS-0,05% Твін-20.

Приклади

У наведених далі прикладах усі використані ферменти, а також реактиви і матеріали були одержані з комерційних джерел, якщо не вказано інше.

Приклад 1. Одержання химерного МАб РЗ

Синтез кДНК відбувався шляхом реакції з ревертазою, із започаткування з РНК гібридами, що продукує МАб РЗ, як описувалось раніше. Показана послідовність специфічних праймерів, що були використані у цій реакції:

Для VH:

5' AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC 3'

Для VK:

5' GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG 3'

кДНК VHP3 та кДНК VKP3 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із застосуванням Таq-полімерази та специфічних праймерів. Сайтами рестрикції, що включались до праймерів, були ECORV/NHEI для VH та ECORV/SAL I для VK. Були використані такі праймерні послідовності:

Для VH:

Праймер 1 (сигнальний пептид):

5' GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Праймер 2 (CH1):

5' GGGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT 3'

Для VK:

Праймер 1 (сигнальний пептид):

5' GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)T 3'

Праймер 2 (Cκ):

5' AGCGTCTGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Продукти полімеразної ланцюгової реакції клонували до вектора TA (набір для клонування TA cloning kit, фірма Invitrogen). Дванадцять незалежних клонів секвенували дидезокси методом встановлення первинної структури ДНК із застосуванням T7 ДНК-полімерази (фірма Pharmacia). Аналізом пошуку гомологій визначили найгомологічнішу послідовність для VHP3 та VKP3. Послідовності VHP3 та VKP3 (Фіг.1 та Фіг.2) мають високу гомологію з групами IB та V, відповідно, за класифікацією Кабата.

Після розщеплення рестриктазами ECORV та NHEI для VHP3 та ECORV і SAL I для VKP3, їх клонували до векторів експресії, попередньо розщеплених тими саме ферментами, PAH4604 та PAG4622 для VH та VK, відповідно. Ці вектори експресії були подаровані Шері Моррісон (Sherie Morrison) (UCLA, Каліфорнія, США); вони є придатними для експресії імуноглобулінів у клітинах ссавців. Вектор PAH 4604 включає константну ділянку людського LgG1, а вектор PAG 4622 включає людську Cκ [Колома (Coloma) та інші (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, J. Immunol. Meth., 152: 89-104]. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як P3VH-PAH4604 та P3VK-PAG4622.

Клітини NS-0 трансфікували 10мкг P3VK-PAG4622, клон, що експресував легкий ланцюг, трансфікували 10мкг P3VH-PAH4604; у обох випадках ДНК лінеаризували за допомогою PvuI, осаджували етанолом та розчиняли у 50мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину перед трансфекцією.

Приблизно 10^7 клітин збирали шляхом центрифугування і ресуспендували у 0,5мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину разом із розщепленою ДНК у електропораційній кюветі. Після 10хв. на льоду, клітини піддавались імпульсу електричного току (200В, 960мкФ) і залишались на льоду додатково впродовж 10хв. Після цього клітини розподіляли до 96-луноквого планшета з модифікованим за способом Дульбекко живильним середовищем Ігла F12 плюс 10% фетальної телячої сироватки. Через два або чотири дні додавали селективне середовище (модифіковане за способом Дульбекко живильне середовище Ігла F12 із мікофеноловою кислотою (0,45мкг/мл) або гістидином (10мМ розчин), відповідно). Трансфіковані клони спостерігались неозброєним оком через 14 днів.

Присутність людського антитіла у живильному середовищі лунок, що містили трансфіковані клони, визначали шляхом твердофазного імунферментного аналізу (ELISA). Лунки титраційного мікропланшета сенсibiliзували козячим антилюдським легким каппа-ланцюгом (для клонів, що продукують людський каппа-ланцюг) або антилюдськими IgG (специфічними для гамма-ланцюга) (для клонів, що продукують повне антитіло) антитілами. Після промивання PBS-T (забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05% Твін-20) розбавлене культуральне середовище лунок, що містять трансфектанти, додавали до кожної лунки титраційного мікропланшета на 1год. при температурі 37°C. Лунки промивали PBS-T, додавали козячий антилюдський легкий каппа-ланцюг, кон'югований із пероксидазою із хрому або козячий антилюдський IgG, кон'югований із лужною фосфатазою (специфічний для гамма-ланцюга), та інкубували при кімнатній температурі впродовж 1год. Лунки промивали PBS-T і додавали субстратний буфер, що включав о-фенілендіамін або р-нітрофенілфосфат, відповідно. Через півгодини визначали оптичну густина при 492нм або 405нм, відповідно.

Приклад 2. Одержання різних варіантів іуманізованого антитіла РЗ

Послідовності мишачих VHP3 та VKP3 (Фіг.1 та Фіг.2) порівнювали з людськими послідовностями. На Фіг.3 та Фіг.4 показані найгомологічніші людські послідовності. На послідовностях варіабельної ділянки мишачого РЗ відшукували спіральні амфіпатичні ділянки або потенційні Т-клітинні антигенні детермінанти і за згаданим способом визначали розважливу стратегію заміни амінокислот із метою руйнування або гуманізації потенційних Т-клітинних антигенних детермінант у межах мишачих послідовностей.

Аналіз VHP3 виявив (Фіг.3) 2 амфіпатичні сегменти, перший з яких охоплює CDR1, FR2 та деякі залишки

CDR2, у той час як другий охоплює кінець FR3 та CDR3. Головні різниці мишачої послідовності, порівняно з найгомологічнішою людською послідовністю, були знайдені у гіперваріабельних ділянках або залишках, залучених до тривимірної структури сайту зв'язування. З цієї причини було вирішено не замінювати жодної амінокислоти у мишачій VHP3.

Аналіз VKP3 також виявив 2 амфіпатичні сегменти (Фіг.4), перший з яких охоплює FR1, другий охоплює CDR2 та деякі залишки FR3. Було вирішено замінити залишки у положеннях 8, 9, 10, 11 та 13 залишками у тому саме положенні найгомологічнішої людської послідовності. Амінокислоти His, Lys, Phe, Met та Thr були замінені на Pro, Ser, Ser, Leu та Ala, відповідно. Заміну здійснили шляхом перекиривання полімеразних ланцюгових реакцій [Камманн (Kammann) та інші (1989): Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), Nucleic Acids Res., 17:5404] із застосуванням праймерів 1 та 2 і 3 та 4, послідовності яких виглядають таким чином:

Праймер 1:

5' ATGACCCAGTCTCCTTCTTCTCTTTCCGCGTCAGTAGGAGAC 3'

Праймер 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Праймер 3:

5' GTCTCCTACTGACGCGAAAGAGAAGAAGGAGACTGGGTCAT 3'

Праймер 4:

5GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)T3'

Точкові мутації були перевірені секвенуванням. Одержана генно-інженерна конструкція була позначена як P3VKhu і клонувана до вектора експресії PAG 4622. Одержали генно-інженерну конструкцію P3VKhu-PAG4622.

Для експресії гуманізованого антитіла P3 клітини NS-0 трансфікували P3VH-PAH4604 та P3VKhu-PAG4622.

Антитіло P3hu трансфікували за тією самою методикою електропорації та виявлення, опис якої було наведено перед тим для химерних антитіл.

Приклад 3: Біологічна активність химерного МАб P3

Біологічну активність химерного МАб P3 перевіряли за специфічним зв'язуванням з антигеном, що визначали шляхом ELISA.

Для рекомбінантного МАб P3, титрувальні мікропланшети сенсibiliзували розчином GM3(NeuGc) гангліозиду у метанолі. Після просушування впродовж 1год. при температурі 37°C, неспецифічне зв'язування блокували 1% розчином сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (BSA) у трис-НСІ буфері та інкубували впродовж 1год. при температурі 37°C. Лунки промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином та інкубували впродовж 1год. при температурі 37°C з очищеним рекомбінантним МАб P3. Лунки промивали трис-НСІ, додавали козяче антилюдське антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою та інкубували при температурі 37°C впродовж 1год. І, нарешті, лунки промивали трис-НСІ і додавали субстратний буфер, що включав р-нітрофенілфосфат. Через півгодини визначали оптичну густину при 405нм.

Химерне МАб T1 використовували як негативний контроль.

На Фіг.5 зображено специфічне зв'язування химерного МАб P3 з антигеном.

Приклад 4. Одержання химерного МАб 1E10

Синтез кДНК відбувався шляхом реакції з ревертазою, із започаткування з РНК гібридами, що продукує МАб 1E10, як описувалось раніше. Далі показана послідовність специфічних праймерів, що були використані у цій реакції:

Для VH:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Для VK:

5' GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGGA 3'

кДНК VH1E10 та кДНК VK1E10 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із застосуванням Taq-полімерази та специфічних праймерів

Для VH:

Праймер 1 (сигнальний пептид):

5' GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Праймер 2 (CH1):

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Для VK:

Праймер 1 (сигнальний пептид):

5' GGGGTAAACCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)GCTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GG(GA) 3'

Праймер 2 (Cк):

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Продукти полімеразної ланцюгової реакції клонували до вектора TA (набір для клонування TA cloning kit, фірма Invitrogen). Дванадцять незалежних клонів секвенували (Фіг.7 та Фіг.8) дидезокси методом встановлення первинної структури ДНК із застосуванням T7 ДНК-полімерази (фірма Pharmacia). Аналізом пошуку гомологій визначили найгомологічнішу послідовність для VH1E10 та VK1E10. Послідовності VH1E10 та VK1E10 мають високу гомологію з різними групами та групою V, відповідно, за класифікацією Кабата.

Після розщеплення рестриктазами ECORV та NHEI для VH1E10 та Hindi і SALI для VK1E10, їх клонували до векторів експресії, попередньо розщеплених придатними ферментами, PAH4604 та PAG4622 для VH та VK, відповідно. Ці вектори експресії були подаровані Шері Моррісон (Sherie Morrison) (UCLA, Каліфорнія, США);

5 вони є придатними для експресії імуноглобулінів у клітинах ссавців. Вектор PAH 4604 включав константну ділянку людського LgG1, а вектор PAG 4622 включав людську Ck [Колома (Coloma) та інші (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, J. Immunol. Meth., 152: 89-104]. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як 1E10VH-PAH4604 та 1E10VK-PAG4622.

Клітини NS-0 трансфікували 10мкг 1E10VK-PAG4622, клон, що експресував легкий ланцюг, трансфікували 10мкг 1E10VH-PAH4604; у обох випадках ДНК лінеаризували за допомогою PvuI, осаджували етанолом та розчиняли у 50мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину перед трансфекцією.

10 Приблизно 10^7 клітин збирали шляхом центрифугування і ресуспендували у 0,5мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину разом із розщепленою ДНК у електропораційній кюветі. Після 10хв. на льоду, клітини піддавались імпульсу електричного току (200В, 960мкФ) і залишались на льоду додатково впродовж 10хв. Після цього клітини розподіляли до 96-лункового планшета з модифікованим за способом Дульбекко живильним середовищем Ігла F12 плюс 10% фетальної телячої сироватки. Через два або чотири дні додавали селективне середовище (модифіковане за способом Дульбекко живильне середовище Ігла F12 із мікофеноловою кислотою (0,45мкг/мл) або гістидином (10мМ розчин), відповідно). Трансфіковані клони спостерігались неозброєним оком через 14 днів.

15 Присутність людського антитіла у живильному середовищі лунок, що містили трансфіковані клони, визначали шляхом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Лунки титраційного мікропланшета сенсibiliзували козячим антилюдським легким каппа-ланцюгом (для клонів, що продукують людський каппа-ланцюг) або антилюдськими IgG (специфічними для гамма-ланцюга) (для клонів, що продукують повне антитіло) антитілами. Після промивання PBS-T (забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05% Твін-20) розбавлене культуральне середовище лунок, що містять трансфектанти, додавали до кожної лунки титраційного мікропланшета на 1год. при температурі 37°C. Лунки промивали PBS-T, додавали козячий антилюдський легкий 25 каппа-ланцюг, кон'югований із пероксидазою із хрому або козячий антилюдський IgG, кон'югований з лужною фосфатазою (специфічний для гамма-ланцюга), та інкубували при кімнатній температурі впродовж 1год. Лунки промивали PBS-T, і додавали субстратний буфер, що містив о-фенілендіамін або р-нітрофенілфосфат, відповідно. Через півгодини визначали оптичну густину при 492нм або 405нм, відповідно.

Приклад 5. Одержання різних варіантів гуманізованого антитіла 1E10

30 Послідовності мишачих VH1E10 та VK1E10 (Fig.6 та Fig.7) порівнювали з людськими послідовностями. На Fig.8 та Fig.9 показані найгомологічніші людські послідовності. На послідовностях варіабельної ділянки мишачого 1E10 відшукували спіральні амфіпатичні ділянки або потенційні Т-клітинні антигенні детермінанти, і за згаданим способом визначали розважливу стратегію заміни амінокислот із метою руйнування або гуманізації потенційних Т-клітинних антигенних детермінант у межах мишачих послідовностей.

35 Аналіз VH1E10 виявив (Fig.8) 3 амфіпатичні сегменти, перший з яких охоплює FR1, другий охоплює FR2, третій охоплює FR3. Було вирішено замінити залишки у положеннях 5, 40, 42 та 87 (83 за нумерацією Кабата) залишками у тому саме положенні найгомологічнішої людської послідовності. Амінокислоти Gln, Arg, Glu та Thr були замінені на Val, Ala, Gly та Arg, відповідно.

40 Заміну здійснили шляхом перекривання полімеразних ланцюгових реакцій [Камманн (Kammann) та інші (1989): Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), Nucleic Acids Res., 17:5404] із застосуванням різних наборів праймерів.

Праймерами для мутації у положенні 5 важкого ланцюга були праймери 1, 2, 3 та 4, послідовності яких виглядають таким чином:

Праймер 1:

45 5' CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCT 3'

Праймер 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Праймер 3:

5' AGCTCCAGACTGCACCAGCTGAACCTG 3'

50 Праймер 4:

5' GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Після секвенування точкової мутації у положенні 5, були здійснені мутації у положеннях 40 та 42.

Праймер для мутацій у положеннях 40 та 42 важкого ланцюга:

Праймер 1:

55 5' TGGGTGAGGCAGGCGCCTGGGCAGGGACTTGAG 3'

Праймер 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Праймер 3:

5' CTCAGTCCCTGCCCAGGCGCCTGCCTCACCCA 3'

60 Праймер 4:

5' GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Після секвенування точкової мутації у положеннях 40 та 42, була здійснена мутація у положенні 87 (83 за нумерацією Кабата).

Праймер для мутації у положенні 87 (83 за нумерацією Кабата) важкого ланцюга:

65 Праймер 1:

5' CTCAGCAGGCTGCGGTCTGAGGACTCT 3'

Праймер 2:
5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Праймер 3:
5' AGAGTCCTCAGACCCGACGCTGCTGAG 3'

Праймер 4:
5' GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Інші заміни не робили, оскільки залишки були залучені до тривимірної структури сайту зв'язування.

Точкові мутації були перевірені секвенуванням. Одержана генно-інженерна конструкція була позначена як 1E10VHhu і клонована до вектора експресії pAN4604. Одержали генно-інженерну конструкцію 1E10VH-pAN4604.

Аналіз VK1E10 також виявив 3 амфіпатичні сегменти (Фіг.9), перший з яких охоплює FR1, другий охоплює CDR1, третій охоплює FR3. Було вирішено замінити залишки у положеннях 7, 8 та 15 залишками у тому саме положенні найгомологічнішої людської послідовності. Амінокислоти Thr, Thr та Leu були замінені на Ser, Pro та Val, відповідно. Заміну здійснили шляхом перекиривання полімеразних ланцюгових реакцій [Камманн (Kammann) та інші (1989): Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), *Nucleic Acids Res.*, 17:5404] із застосуванням праймерів 1, 2, 3 та 4, послідовності яких виглядають таким чином:

Праймери для мутації у положеннях 7, 8 та 15 легкого ланцюга:

Праймер 1:
5' CAGATGACACAGTCTCCTTCCCTCCCTGTCTGCCCTGTGGGAGACAGAGTC 3'

Праймер 2:
5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Праймер 3:
5' GACTCTGTCTCCACAGAGGCAGACAGGGAGGAAGGAGACTGTGTCATCTG 3'

Праймер 4:
5' GGGGTAAACCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)GCTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GG(GA) 3'

Точкові мутації були перевірені секвенуванням. Одержана генно-інженерна конструкція була позначена як 1E10Vkhhu і клонована до вектора експресії pAG 4622. Одержали генно-інженерну конструкцію IEMVKhhu-pAG4622.

Для експресії гуманізованого антитіла 1E10, клітини NS-0 трансфікували 1E10VHhu-pAN4604 та 1E10VKhhu-pAG4622.

Антитіло 1E10hu трансфікували за тією самою методикою електропорації та виявлення, опис якої було наведено перед тим для химерних антитіл.

Приклад 6: Біологічна активність химерного MAб 1E10

Біологічну активність химерного MAб 1E10 перевіряли за специфічним зв'язуванням з антигеном, що визначали шляхом ELISA.

Для рекомбінантного MAб 1E10, титрувальні мікропланшети сенсibilізували MAб P3. Після промивання PBS-T (забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05% Твін-20), неспецифічне зв'язування блокували 1% розчином сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (BSA) у PBS-T та інкубували впродовж 1 год. при температурі 37°C. Лунки промивали, та інкубували впродовж 1 год. при температурі 37°C з очищеним рекомбінантним MAб 1E10. Лунки промивали PBS-T, додавали козяче антилюдське антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою та інкубували при температурі 37°C впродовж 1 год. І, нарешті, лунки промивали PBS-T і додавали субстратний буфер, що містив р-нітрофенілфосфат. Через півгодини визначали оптичну густину при 405нм.

Химерне MAб C5 використовували як негативний контроль.

На Фіг.10 показано специфічне зв'язування химерного MAб 1E10 з MAб P3.

Фіг.1: Визначені нуклеотидні та амінокислотні послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла P3. Нумерація амінокислот відповідає класифікації Кабата [Кабат (Kabat) та інші (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*, п'яте видання, Національний Інститут Здоров'я (США)]. Гіперваріабельні ділянки позначені штрих-пунктирними лініями.

Фіг.2: Визначені нуклеотидні та амінокислотні послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла P3. Нумерація амінокислот відповідає класифікації Кабата [Кабат (Kabat) та інші (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*, п'яте видання, Національний Інститут Здоров'я (США)]. Гіперваріабельні ділянки позначені штрих-пунктирними лініями.

Фіг.3: Порівняльний аналіз VHP3 із найгомологічнішою людською послідовністю. Амфіпатичні сегменти підкреслені, гіперваріабельні ділянки позначені жирним шрифтом.

Фіг.4: Порівняльний аналіз VKP3 із найгомологічнішою людською послідовністю. Амфіпатичні сегменти підкреслені, гіперваріабельні ділянки позначені жирним шрифтом.

Фіг.5: Специфічне зв'язування химерного MAб P3 з GM3(NeuGc). Шляхом ELISA випробували різні концентрації MAб P3 та MAб T1 (негативний контроль). Титраційні мікропланшети сенсibilізували розчином GM3(NeuGc) та GM3(NeuAc) (негативний контроль) гангліозиду у метанолі і визначали специфічне зв'язування.

Фіг.6: Визначені нуклеотидні та амінокислотні послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 1E10. Нумерація амінокислот відповідає класифікації Кабата [Кабат (Kabat) та інші (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*, п'яте видання, Національний Інститут Здоров'я (США)]. Гіперваріабельні ділянки позначені штрих-пунктирними лініями.

Фіг.7: Визначені нуклеотидні та амінокислотні послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 1E10. Нумерація амінокислот відповідає класифікації Кабата [Кабат (Kabat) та інші (1991). *Sequences of*

proteins of immunological interest, п'яте видання, Національний Інститут Здоров'я (США)]. Гіперваріабельні ділянки позначені штрих-пунктирними лініями.

Фіг.8: Порівняльний аналіз VH1E10 із найгомологічнішою людською послідовністю. Амфіпатичні сегменти підкреслені, гіперваріабельні ділянки позначені жирним шрифтом.

Фіг.9: Порівняльний аналіз VK1E10 із найгомологічнішою людською послідовністю. Амфіпатичні сегменти підкреслені, гіперваріабельні ділянки позначені жирним шрифтом.

Фіг.10: Специфічне зв'язування мишачого МАb Р3 з химерним МАb 1E10. Шляхом ELISA випробували різні концентрації МАb 1E10 та МАb С5 (негативний контроль). Титраційні мікропланшети сенсibiliзували МАb Р3 та МАb А3 (негативний контроль) і визначали специфічне зв'язування.

Формула винаходу

1. Химерне моноклональне антитіло, одержане із мишачого моноклонального антитіла МАb Р3, що розпізнає гангліозиди, які включають N-гліколільовану сіалову кислоту, яке продукується лінією клітин гібридами, депонованою у ЕСАСС під № 94113026, причому гіперваріабельні домени важкого та легкого ланцюгів згаданого антитіла мають такі послідовності:

важкий ланцюг:

CDR1: RYSVH

CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS

CDR3: SGVREGRAQAWFAY

легкий ланцюг:

CDR1: KASQDVSTAVA

CDR2: SASYRYT

CDR3: QQHYSTPWT

і причому каркасні ділянки (FRs) його важкого та легкого ланцюгів включають такі послідовності:

важкий ланцюг:

FR1: QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSL

FR2: WVRQPPGKGLEWLG

FR3: RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYCAR

FR4: WGQGTLV

легкий ланцюг:

FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

FR2: WYQKPKGQSPKLLIY

FR3: GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYC

FR4: FGGGTKL.

2. Моноклональне антитіло за п. 1, причому воно включає щонайменше одну з наведених далі замін для його гуманізації та збереження властивостей зв'язування з антигеном:

легкий ланцюг:

Положення 8: His на Pro

Положення 9: Lys на Ser

Положення 10: Phe на Ser

Положення 11: Met на Leu

Положення 13: Thr на Ala.

3. Моноклональне антитіло за п. 1 або 2, причому константна ділянка важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність ланцюга гамма-1 і константна ділянка легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність каппа-ланцюга, та обидві ці амінокислотні послідовності одержані з людських імуноглобулінів.

4. Лінія клітин, що продукує будь-яке з моноклональних антитіл за пп. 1-3.

5. Фармацевтична композиція для лікування злоякісних пухлин молочної залози та меланом, їхніх метастазів та рецидивів, що включає будь-яке з моноклональних антитіл за пп. 1-3.

6. Фармацевтична композиція для локалізації та ідентифікації in vivo злоякісних пухлин молочної залози та меланом, їхніх метастазів та рецидивів, яка містить будь-яке з моноклональних антитіл за пп. 1-3.

7. Застосування моноклонального антитіла за будь-яким із пп. 1-3 для виготовлення лікарського засобу, придатного для лікування злоякісних пухлин молочної залози та меланом, їхніх метастазів та рецидивів.

Фиг. 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 Q V Q L K E S G P Q L V A P S Q S L R I T C T V S
 YK 21 CAG CTG CAG CTG AAG CAG TCA CCA CCT GCG CTG CTG CCA CCT TCA CAG AGC CTG CCG ATC ACA TCG ACT GCG TCT

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 35a 35b 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
 Q P S L S M I S V N K V K Q P P Q K Q L E M L
 YK 23 GGG TTC TCA TTA TCC AGA TAT ACT GTA CAC TCG GTT GCG CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG

49 50 51 52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70
 Q M I W G G P I Q I H P A D E E R L S T S
 YK 25 GGG ATG ATA TGG GGT GGT GGA AGC AGA GAC GAT AAT TCA GCT CTG AAA TCC AGA CTG AGC ATC AGC

71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92
 E D M S K E Q V F L K N M S L Q T D D T A W Y Y C
 YK 27 AAG GAC AAG TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AAA ATG AAC AAT CTG CAA ACT GAT GAC ACA GCG AAG TAC TAC TGT

93 94 95 96 97 98 99 100 100a b c d e f 101 102 103 104 105 106 107 108 109
 X A S Q Y M P C M A Q A W F A Y W Q O G T L Y
 YK 29 CCG AAA AGT GGG GTA CCA GAG GGA AGG GCC CAG CCG TCG TTY GCT TAC TGG GCG CAA GCG ACT
 CTG CTT

Фиг. 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 D I V H T Q S H K F H S Y S V D H R V E I T C T A
 YK 31 GGC ATT GCG AGG ACC CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC ACC ATC ACC TCG AAG GCG

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
 G O P V S T A V A W X Q O K P Q S P K L L I Y S
 YK 33 AGT CAG GAT GTC AGT ACT GCT GTA GCG TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCG AAA GTA CTG ACT TAC TCG

51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 A S V R Y T G V E P R E T G S G S G T D P T T T I
 YK 35 GCA TCC TAC GCG TAC ACT GGA GTC CCG GAT CCG TTC ACT GCG AGT GGA ACT GGG ACC GAT TTC ACT TTC ACC ATC

76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
 S S V G A W D L R V Y Y Y C Q Q H Y S T E N T Y G S
 YK 37 AAG ACT GTC GAG GCT CCA GAC CTG CCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAT ACT ACT CCG TGG ACC TTC GGT GGA

101 102 103 104
 G T K C
 YK 39 GCG ACC AAG CTG

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2

ΦΙΓ. 6

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 Q V Q D D Q Q Q A E L Y K P Q A S Y K L S C K A E
 VK1E10 CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA GCT GAA CTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GAG AAG TTT TCC TCC AAG GCT GCT

CDR1

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36a 37b 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
 Q Y T P T S Y D I E H V R Q R Y R Q G L E M I
 VK1E10 GGC TAC AGC TTC ACA AGC TAC GAT ATA AAC TGG GAG AAG CAG AAG CCT GAA CAG GAA CTT GAG TCG ATT

CDR2

49 50 51 52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70
 Q W I P E G S Q S I K Y M R K F S Q K A T L T
 VK1E10 GCA TGG ACT TTT CCT GGA GAT GGT AGT ACT AAG TAC AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT

71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92
 T D K S S S X A Y M Q L S R L T S X D S A V Y T C
 VK1E10 ACA GAC AAA TCC TCC AAG ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGG CTG ACA TGT GAG GAC TGT GCT GTC GAT TTC TGT

CDR3

93 94 95 96 97 98 99 100 100a b c d 101 102 103 104 104 104 107 108 109 110 111
 A R W S Y E S W S Y I D Y K G Q G T T L V Y
 VK1E10 GCA AAG GAA GAC TAC GAT GAG AAC TCC GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC ACT CTC ACA GTC

ΦΙΓ. 7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 D L Q N T Q T Y S E L S A S L G D R V E I S C E A
 VK1E10 GAT ATC CAG AAG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC GCT CTG GGA GAC AAG GTC ACC ATC AGT TCC AGG GCA

CDR1

26 27 27a 27b 27c 27d 27e 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
 S Q D I S N Y L W W Y G Q K P D G T V
 VK1E10 AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTC

CDR2

45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69
 K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S G S G S G T
 VK1E10 AAG CTC CTG ATC TAG TAC ACA ACA AGA GTA CAC TCA GGA GTC GCA TCA AAG TTC ACT GGC AGT GGS TGT GGA ACA

CDR3

70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94
 D Y S L E I S M L E Q E D I A T Y F C Q Q Q R T L
 VK1E10 GAT TAT TCT CTC ACC ATC ACC AAC CTG CAG CAA GAA GAT ATT GGC ACT TAC TTT TCC CAA CAG GGT AAT AGC GTC

95 95a 95b 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
 P W T F Q G Q T K E E S E E
 VK1E10 CCG TGG ACC TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2

Фиг. 8

10 20 30 40 50 60
 VH1E10 QVQLCQSGAEIVKPGASVKLSCKASGVTFTISYDINWURORPEQGLEWIGNTYFGDGGSTTY

huhovH QTQLVCSQAEIVKPGASVVRVSKASGVTFTISYDINWURORPEQGLEWIGNTYFGDGGSTTY

10 20 30 40 50 60
 70 80 90 100 110
 VH1E10 NAKFKGKATLITTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYPCAREP-----YY--DNBYTFDYNQD

huhovH ARRFQGRVYIMTRDAGFSTAYMDLRSLSRSDSAVYPCAKSDPFWSDVYNFDYSVLLDVRGQ

70 80 90 100 110 120

VH1E10 GTTDTV

GTTLDT

huhovH GTTDTV

Фиг. 9

10 20 30 40 50
 VK1E10 DIQNTQITSSLSASLGDRTVITCRASQILSNLWYQQKPDGTVKLLIYTERLHSGVP

huhovK DIQNTQITSSLSASVGBRVTITCRASZTISNLEWYZZKPKAPBLIYAASBLHSGVP

10 20 30 40 50
 60 70 80 90 100

VH1E10 SRFGSGSGSDYSLTISNLEQSDIATYFQGGNTLFWTFGGGKLESK

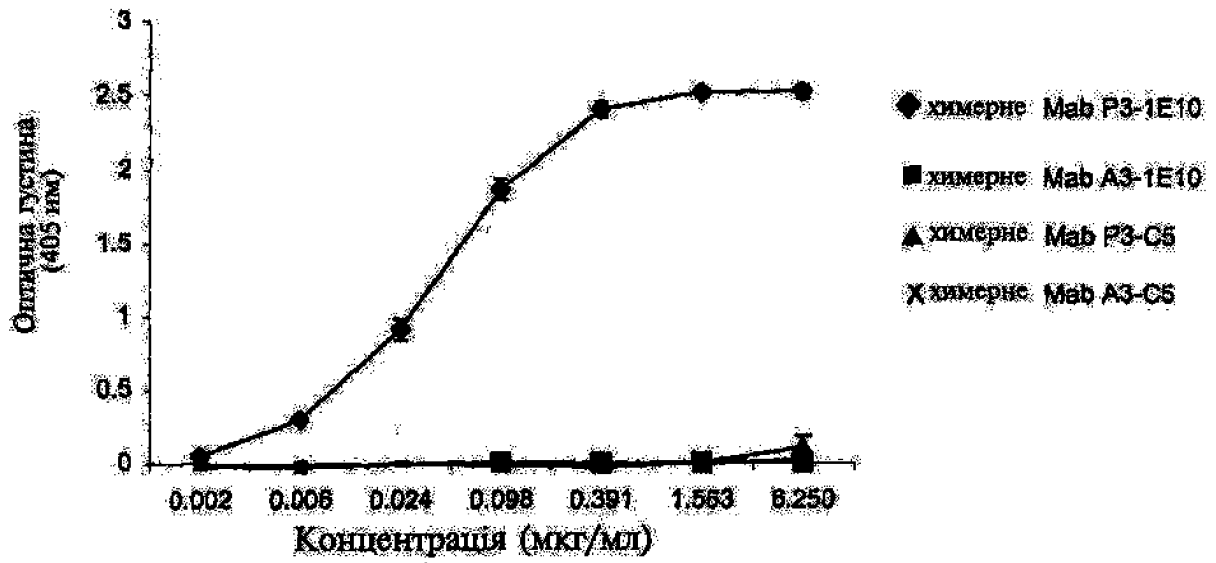
huhovK SRFGSGSGSDYSLTISNLEQSDIATYFQGGNTLFWTFGGGKLESK

60 70 80 90 100

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2

ФІГ. 10



Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 4, 15.04.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 7 5 3 9 3 C 2

U A 7 5 3 9 3 C 2