РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2011 111 725** (13) **A**

(51) МПК
C12N 15/09 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2011111725/10, 28.08.2009**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
29.08.2008 DK PA200801190
02.09.2008 US 61/136,390

(43) Дата публикации заявки: **10.10.2012** Бюл. № **28**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **29.03.2011**

(86) Заявка PCT:
DK 2009/050219 (28.08.2009)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2010/022738 (04.03.2010)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. А.В. Мицу, рег.№ 364

(71) Заявитель(и):
СИМФОГЕН A/C (DK)

(72) Автор(ы):
НИЛЬСЕН Ларс Согор (DK),
ЕНСЕН Аллан (DK),
ПАЙК Чарльз (DK),
ЙЕНСЕН Анне Марие Валентин (DK),
КОФОД Клаус (DK),
ТОРН Метте (DK)

(54) СПОСОБ КЛОНИРОВАНИЯ АНТИТЕЛ ПТИЦ

(57) Формула изобретения

1. Способ получения библиотеки когнатных пар, содержащей соединенные последовательности, кодирующие вариабельные области, где указанный способ включает:

a) получение содержащей лимфоциты клеточной фракции от донора, принадлежащего к классу птиц;

b) получение популяции выделенных одиночных клеток путем распределения клеток из указанной клеточной фракции по отдельности во множество емкостей, причем по меньшей мере субпопуляция клеток экспрессирует гены иммуноглобулинов и, необязательно, любой маркерный антиген B-клеток птиц; и

c) амплификацию и осуществление соединения кодирующих вариабельные области последовательностей, содержащихся в указанной популяции выделенных одиночных клеток, путем амплификации, в процедуре мультиплексной молекулярной амплификации, представляющих интерес нуклеотидных последовательностей с использованием матрицы, полученной из выделенной одиночной клетки или популяции изогенных клеток, и осуществления соединения представляющих интерес амплифицированных нуклеотидных последовательностей.

2. Способ по п.1, в котором субпопуляция клеток характеризуется любым из

RU 2011111725 A

RU 2011111725 A

следующих признаков:

- экспрессия IgY (IgY^+),

- экспрессия IgY и отсутствие экспрессии CD3 (IgY^+ $CD3^-$),

- экспрессия IgY, отсутствие экспрессии или низкая экспрессия Bu-1 и отсутствие экспрессии CD3 (IgY^+ $Bu\text{-}1^-$ $CD3^-$),

- экспрессия Bu-1 и IgY ($Bu\text{-}1^+$ IgY^+),

- экспрессия Bu-1 и IgY и отсутствие экспрессии CD3 ($Bu\text{-}1^+$ IgY^+ $CD3^-$),

- экспрессия Bu-1, но отсутствие экспрессии каких-либо маркеров моноцитов ($Bu\text{-}1^+$, $monocyte^-$),

- экспрессия Bu-1 и отсутствие экспрессии или низкие уровни экспрессии IgM ($Bu\text{-}1^+$ IgM^-), или

- экспрессия Bu-1 и BAFF ($Bu\text{-}1^+$ $BAFF^+$).

3. Способ по п.2, в котором субпопуляция клеток представляет собой IgY^+, например, в котором субпопуляция клеток представляет собой IgY^+ $CD3^-$, например, IgY^+ $CD3^-$ $Bu\text{-}1^-$.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором перед проведением амплификации и соединения индивидуальные выделенные одиночные клетки в популяции одиночных клеток размножают до популяций изогенных клеток.

5. Способ по любому из пп.1-3, в котором содержащая лимфоциты клеточная фракция содержит спленоциты, цельную кровь, костный мозг, мононуклеарные клетки или лейкоциты, предпочтительно спленоциты или костный мозг, более предпочтительно спленоциты.

6. Способ по любому из пп.1-3, в котором содержащая лимфоциты клеточная фракция или B-лимфоцитарная линия обогащена плазматическими клетками, плазмобластами или B-клетками памяти.

7. Способ по любому из пп.1-3, в котором представляющие интерес нуклеотидные последовательности содержат последовательности, кодирующие вариабельные области иммуноглобулинов, а в результате соединения образуется когнатная пара последовательности, кодирующей вариабельную область легкой цепи, связанной с последовательностью, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи.

8. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий до мультиплексной молекулярной амплификации оценку того, содержит ли популяция лимфоцит-содержащих клеток клетки, экспрессирующие детектируемые уровни IgY и, необязательно, детектируемые уровни IgY и Bu-1.

9. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий обогащение указанной содержащей лимфоциты клеточной фракции популяцией лимфоцитов, экспрессирующих IgY, и, необязательно, IgY и Bu-1, перед мультиплексной молекулярной амплификацией.

10. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий выделение из указанной содержащей лимфоциты популяции клеток, экспрессирующих гены иммуноглобулинов, предпочтительно IgY, и, необязательно, IgY и Bu-1, перед мультиплексной молекулярной амплификацией.

11. Способ по любому из пп.1-3, в котором обогащение или выделение включает процедуру MACS, FACS или другую процедуру автоматизированного сортинга.

12. Способ по любому из пп.1-3, в котором птицей является курица, например, трансгенная курица, которая экспрессирует последовательности иммуноглобулинов человека.

13. Способ по любому из пп.1-3, в котором птицей является утка, гусь, голубь или

RU 2011117725 A

RU 2011117725 A

индейка.

14. Способ по любому из пп.1-3, в котором указанная процедура мультиплексной молекулярной амплификации представляет собой мультиплексную ОТ-ПЦР-амплификацию; где указанная мультиплексная ОТ-ПЦР-амплификация представляет собой двухстадийный процесс, включающий отдельную стадию обратной транскрипции (ОТ) перед мультиплексной ПЦР-амплификацией; или где указанную мультиплексную ОТ-ПЦР-амплификацию проводят в одну стадию, включающую вначале добавление всех компонентов, необходимых для проведения как обратной транскрипции (ОТ), так и мультиплексной ПЦР-амплификации в одной емкости.

15. Способ по любому из пп.1-3, в котором указанное соединение нуклеотидных последовательностей, представляющих интерес, проводят в той же емкости, что и мультиплексную молекулярную амплификацию; например, в котором указанное соединение представляющих интерес нуклеотидных последовательностей выполняют вместе с мультиплексной ПЦР-амплификацией, используя мультиплексную смесь праймеров перекрывания-удлинения.

16. Способ по любому из пп.1-3, в котором проводят дополнительную молекулярную амплификацию с использованием смеси праймеров, адаптированной для амплификации соединенных нуклеотидных последовательностей, представляющих интерес.

17. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий встраивание соединенных нуклеотидных последовательностей или библиотеки когнатных пар в вектор; например, вектор, выбранный из векторов для клонирования, челночных векторов, векторов дисплея и векторов экспрессии; например, где соединенные нуклеотидные последовательности или индивидуальные представители библиотеки когнатных пар содержат последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, ассоциированную с последовательностью, кодирующей вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, и указанные последовательности встроены с соблюдением рамки считывания в вектор, содержащий последовательности, кодирующие один или несколько константных доменов иммуноглобулина или их фрагменты.

18. Способ по п.17, дополнительно включающий создание суббиблиотеки путем отбора субпопуляции когнатных пар соединенных последовательностей вариабельных областей, которые кодируют связывающие белки со специфичностью к желаемой мишени, с созданием таким образом библиотеки мишень-специфичных когнатных пар последовательностей, кодирующих вариабельные области.

19. Способ по п.17, дополнительно включающий перенос указанной когнатной пары или библиотеки мишень-специфичных когнатных пар последовательностей, кодирующих вариабельные области, в вектор экспрессии млекопитающих; например, где вектор экспрессии млекопитающих кодирует один или несколько доменов константных областей, выбранных из классов иммуноглобулинов человека IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, легкой каппа-цепи и легкой лямбда-цепи.

20. Способ по п.17, дополнительно включающий стадии:

a) введения вектора, кодирующего сегмент соединенных нуклеотидных последовательностей, в клетку-хозяина;

b) культивирования указанных клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии; и

c) получения белкового продукта, экспрессируемого вектором, введенным в указанную клетку-хозяина; предпочтительно, где указанным белковым продуктом является антитело, содержащее когнатную пару вариабельной области легкой цепи, ассоциированной с вариабельной областью тяжелой цепи.

RU 2011111725 A

RU 2011111725 A

21. Способ получения вектора, кодирующего химерное антитело с константными областями человека и вариабельными областями, отличными от человеческих, где указанный способ включает:

a) получение содержащей лимфоциты клеточной фракции от донора, принадлежащего к классу птиц;

b) получение популяции выделенных одиночных клеток путем распределения клеток из указанной клеточной фракции по отдельности во множество емкостей;

c) амплификацию и осуществление соединения нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельные области, содержащихся в указанной популяции выделенных одиночных клеток, путем амплификации, в процедуре мультиплексной молекулярной амплификации, указанных нуклеиновых кислот с использованием матрицы, полученной из выделенной одиночной клетки или популяции изогенных клеток; и осуществления соединения амплифицированных нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельные области тяжелых и легких цепей;

d) осуществление соединения амплифицированных вариабельных областей с константными областями человека; и

e) встраивание полученной нуклеиновой кислоты в вектор.

22. Способ по п.21, в котором по меньшей мере субпопуляция клеток экспрессирует гены иммуноглобулинов и необязательно любой маркерный антиген B-клеток птиц, например, в котором субпопуляция клеток характеризуется любым из следующих признаков:

- экспрессия IgY (IgY^+),

- экспрессия IgY и отсутствие экспрессии CD3 ($IgY^+ CD3^-$),

- экспрессия IgY, отсутствие экспрессии или низкая экспрессия Bu-1 и отсутствие экспрессии CD3 ($IgY^+ Bu\text{-}1^- CD3^-$),

- экспрессия Bu-1 и IgY ($Bu\text{-}1^+ IgY^+$),

- экспрессия Bu-1 и IgY и отсутствие экспрессии CD3 ($Bu\text{-}1^+ IgY^+ CD3^-$),

- экспрессия Bu-1, но отсутствие экспрессии каких-либо маркеров моноцитов ($Bu\text{-}1^+$, $monocyte^-$),

- экспрессия Bu-1 и отсутствие экспрессии или низкие уровни экспрессии IgM ($Bu\text{-}1^+ IgM^-$), или

- экспрессия Bu-1 и BAFF ($Bu\text{-}1^+ BAFF^+$).

23. Способ по п.21 или 22, в котором донором является трансгенная курица, несущая последовательности иммуноглобулинов человека, способная продуцировать иммуноглобулины, полученные из вариабельных областей тяжелых и легких цепей антитела человека или имеющие с ними значительную гомологию.

24. Способ по п.21 или 22, в котором указанная процедура мультиплексной молекулярной амплификации представляет собой мультиплексную ОТ-ПЦР-амплификацию; где указанная мультиплексная ОТ-ПЦР-амплификация представляет собой двухстадийный процесс, включающий отдельную стадию обратной транскрипции (ОТ) перед мультиплексной ПЦР-амплификацией; или где указанную мультиплексную ОТ-ПЦР-амплификацию проводят в одну стадию, включающую вначале добавление всех компонентов, необходимых для проведения как обратной транскрипции (ОТ), так и мультиплексной ПЦР-амплификации в одной емкости.

25. Способ по п.21 или 22, в котором указанное соединение нуклеотидных последовательностей, представляющих интерес, проводят в той же емкости, что и мультиплексную молекулярную амплификацию; например, в котором указанное соединение представляющих интерес нуклеотидных последовательностей выполняют вместе с мультиплексной ПЦР-амплификацией, используя мультиплексную смесь

RU 2011117725 A

RU 2011117725 A

праймеров перекрывания-удлинения.

26. Способ по п.24, в котором ПЦР-продукт встраивают в вектор экспрессии; например, в котором в конструкцию экспрессии встраивают сдвоенную промоторную кассету, причем сдвоенная промоторная кассета способна одновременно управлять экспрессией тяжелой и легкой цепей, предпочтительно, в котором сдвоенная промоторная кассета является двунаправленной.

27. Способ по п.21 или 22, в котором процедура мультиплексной молекулярной амплификации представляет собой мультиплексную ОТ-ПЦР-амплификацию, и в котором ПЦР-продукт встраивают в вектор экспрессии, включающий каркас, содержащий последовательность, кодирующую константную область легкой цепи человека, или ее фрагмент, и/или последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи человека, или ее фрагмент.

28. Способ по п.21 или 22, включающий дополнительную стадию амплификации, в которой к ПЦР-смеси добавляют полинуклеотид, кодирующий константную область легкой цепи человека или ее фрагмент, с перекрыванием, способным обеспечить соединение с вариабельной областью легкой цепи, совместно с набором праймеров, дающим возможность амплификации конструкции, включающей по порядку: VH-цепь курицы, линкер, VL-цепь курицы и константную область легкой цепи человека; или включающий дополнительную стадию амплификации, в которой к ПЦР-смеси добавляют полинуклеотид, кодирующий константную область тяжелой цепи человека или ее фрагмент, с перекрыванием, способным обеспечить соединение с вариабельной областью тяжелой цепи, совместно с набором праймеров, дающим возможность амплификации конструкции, включающей по порядку: константную область тяжелой цепи человека, VH-цепь курицы, линкер и VL-цепь курицы.

29. Библиотека векторов, кодирующих химерные антитела, причем каждое химерное антитело состоит из последовательностей, кодирующих вариабельные области иммуноглобулинов курицы, и константных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека.

30. Библиотека по п.29, в которой последовательности, кодирующие вариабельные области иммуноглобулинов курицы, получены от трансгенной курицы, несущей последовательности иммуноглобулинов человека, способной продуцировать иммуноглобулины, полученные из вариабельных областей тяжелых и легких цепей антител человека или имеющие с ними значительную гомологию.

31. Способ создания библиотеки полученных у птиц последовательностей, кодирующих вариабельные области иммуноглобулинов, где способ включает:

a) получение содержащей лимфоциты клеточной фракции от донора, принадлежащего к классу птиц;

b) получение популяции выделенных одиночных клеток путем распределения клеток из указанной клеточной фракции по отдельности во множество емкостей, причем по меньшей мере субпопуляция клеток экспрессирует гены иммуноглобулинов, например IgY, и, необязательно, по меньшей мере один маркерный антиген B-клеток птиц; и

c) амплификацию кодирующих вариабельные области последовательностей, содержащихся в указанной популяции выделенных одиночных клеток, путем амплификации, в процедуре мультиплексной молекулярной амплификации, представляющих интерес нуклеотидных последовательностей с использованием матрицы, полученной из выделенной одиночной клетки или популяции изогенных клеток.

RU 2011117725 A

RU 2011117725 A