

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 антиідіотипового 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 ацетилованими 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 1E10 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-гліколілльнейрамінова (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 Шенгтунд К. (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 [Хіраші (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 ацетилованими 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 антиідіотипову 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 SO₃⁻ (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].

Антиідіотипове 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]. MAb 1E10 індукує сильний протипухлинний ефект як у сингенних, так і у алогенних мишей. Піст лінії клітин F3II карциноми молочної залози був значно уповільнений повторною дозою MAb 1E10, сполученого з KLH, у ад'юванті Фрейнда у разі імунізації мишей лінії BALB/c. Крім того, після імунізації зменшилась кількість спонтанних легеневи метастаз. Інтравенозне введення MAb 1E10 мишам лінії C57BL/6 через 10-14 днів після інтравенозного введення останнім клітин меланоми B16, викликало різке зменшення кількості легеневи 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 (Koehler) 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 різниці між мишачим антитілом та людським імуноглобуліном, без зміни антигенної розпізнавальної специфічності [Moppicon (Morrison) та Yi (Oi) (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 [Moppicon (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; Верхейн (Verhoeven) 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; Квін (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 найгомлогічнішої 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 вдаватись, 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 Р3, яке продукується лінією клітин гібридами, депонованою у ЕСАСС під №94113026. MAb Р3 розпізнає антиген, що експресується клітинами пухлини молочної залози та меланомами. MAb Р3 відрізняється такими послідовностями гіперваріабельних ділянок (CDRs) важкого та легкого ланцюгів:

Важкий ланцюг:

CDR1: RYSVH

CDR2: MIWGGGSTDYNALKS

CDR3: SGVREGRAQAWFAY

Легкий ланцюг:

CDR1: KASQDVSTAVA

CDR2: SASYRYT CDR3: QQHYSTPWT

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

Важкий ланцюг:

FR1: QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSL

FR2: WVRQPPGKGLEWLG

FR3: RLSISKDNSKSVFLKMNSLQDDTAMYYCAR

FR4: WGQGTLLV

Легкий ланцюг:

FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
FR2: WYQQKPGQSPKLLIY
FR3: GVPDRFTGSGSGTDFFTFTISSVQAEDLAVYYC
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 Ck. За іншим аспектом, цей винахід має відношення до гуманізованого антитіла, яке одержують із MAb P3, що продукується лінією клітин гібридами, депонованою у ECACC під №94113026, що відрізняється тим, що включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG1 та константну ділянку легкого ланцюга людського Ck 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 гібридами, депонованою у ECACC під №97112901, і яке є антидіотиповим 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: KATLTITDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR
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 Ck. За іншим аспектом, цей винахід має відношення до гуманізованого антитіла, яке одержують з MAb 1E10, що продукується лінією клітин гібридами, депонованою у ECACC під №97112901, що відрізняється тим, що включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG1 та константну ділянку легкого ланцюга людського Ck 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: Gin 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 MAbai 1E10

Цитоплазматичну РНК екстрагували із приблизно 10^6 клітин гібридами P3 (мишаче IgM Mab, що розпізнає GM3 N-гліколізований 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 (pH 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°C впродовж 1 год.

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 одиницю 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 ТА (набір для клонування Та 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 ТА 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 ТА шляхом ферментативного розщеплення за допомогою EcoRV та NheI і клонували до вектора експресії (РАН 4604), що включав варіабельну ділянку людського IgG1 і ген стійкості до гістидинолу. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як P3VH-РАН4604 та 1E10VH-РАН4604.

Гени VK вирізували з вектора ТА шляхом ферментативного розщеплення за допомогою EcoRV та Sall і клонували до вектора експресії (РАГ4622). Цей вектор включав ген стійкості до мікофенолової кислоти та людську константну каппа-ділянку. Одержані генно-інженерні конструкції були позначені як P3VK-РАГ4622 та 1E10VK-РАГ4622.

Експресія химерних антитіл, одержаних із МAb P3 та МAb 1E10

Клітини NS-0 піддавали електропорації 10мкг P3VK-РАГ4622 або 1E10VK-РАГ4622; клони, що експресували людські легкі каппа-ланцюги, трансфікували 10мкг P3VH-РАН4604 або 1E10VH-РАН4604.

ДНК лінеаризували шляхом розщеплення ферментом PvuI, осаджували етанолом та розчиняли у 50мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину. Приблизно 10⁷ 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 залишалися 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 з мікофеноловою кислотою (0,45мкг/мл) або гістидинолом (10мМ розчин, відповідно). Трансфіковані клони спостерігалися 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 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.

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

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.

Аналіз гомології з людськими імуноглобулінами

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

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.

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 основних 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.

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

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 заміни. Мутації здійснювали шляхом перекривання полімеразних ланцюгових реакцій.

Клонування та експресія гуманізованих антитіл P3hu та 1E10hu

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, Upssala, Швеція).

Біологічна активність

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

Для рекомбінантного MAb 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 MAb 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 405nm або 492nm, відповідно.

Для рекомбінантного MAb 1E10 ELISA здійснювали подібним же чином, за виключенням того, що лунки сенсibiliзували MAb 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 MAb P3

Синтез кДНК відбувався шляхом реакції з ревертазою, із започаткування з РНК гібридами, що продукує MAb P3, 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 Taq-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 (Ck):

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 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 PАН 4604 включав константну ділянку людського IgG1, а вектор PAG 4622 включав людську Cк [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 P3VН-РАН4604 та P3VК-PAG4622.

Клітини NS-0 трансфікували 10мкг P3VК-PAG4622, клон, що експресував легкий ланцюг, трансфікували 10мкг P3VН-РАН4604; у обох випадках ДНК лінеаризували за допомогою PvuI, осаджували етанолом та розчиняли у 50мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину перед трансфекцією.

Приблизно 10⁷ 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 спостерігалися неозброєним оком через 14 днів.

Присутність людського антитіла у живильному середовищі лунок, що містили трансфіковані клони, визначали шляхом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Лунки титраційного мікропланшета сенсibilізували 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-фенілєндіамін або р-нітрофенілфосфат, відповідно. Через півгодини визначали оптичну густину при 492нм або 405нм, відповідно.

Приклад 2. Одержання різних варіантів їуманізованого антитіла P3

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 P3 відшукували спіральні амфipатичні 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 амфipатичні 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 амфipатичні 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 перекидання 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' GTCTCCTACTGACGCGGAAAGAGAAGAAGGAGACTGGGTCAT 3'

Праймер 4:

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

Точкові мутації були перевірені секвенуванням. Одержана генно-інженерна конструкція була позначена як P3Vкhu і клонована до вектора експресії PAG 4622. Одержали генно-інженерну конструкцію P3Vкhu-PAG4622.

Для експресії їуманізованого антитіла P3 клітини NS-0 трансфікували P3VН-РАН4604 та P3Vкhu-PAG4622.

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

Приклад 3: Біологічна активність химерного MAb P3

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

Для рекомбінантного MAb P3, титрувальні мікропланшети сенсibilізували 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-HCl 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 MAb P3. Лунки промивали трис-HCl, додавали козяче антилюдське антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою та інкубували при температурі 37°C впродовж 1год. І, нарешті, лунки промивали трис-HCl і додавали субстратний буфер, що включав р-нітрофенілфосфат. Через півгодини визначали оптичну густину при 405нм.

Химерне MAb T1 використовували як негативний контроль.

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

Приклад 4. Одержання химерного MAb 1E10

Синтез кДНК відбувався шляхом реакції з ревертазою, із започаткування з РНК гібридами, що продукує MAb 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); вони є придатними для експресії імуноглобулінів у клітинах ссавців. Вектор PAH 4604 включав константну ділянку людського LgG1, а вектор PAG 4622 включав людську Cк [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.

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.

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 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-фенілєндіамін або р-нітрофенілфосфат, відповідно. Через півгодини визначали оптичну густину при 492нм або 405нм, відповідно.

Приклад 5. Одержання різних варіантів гуманізованого антитіла 1E10

Послідовності мишачих VH1E10 та VK1E10 (Фіг.6 та Фіг.7) порівнювали з людськими послідовностями. На Фіг.8 та Фіг.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.

Аналіз VH1E10 виявив (Фіг.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.

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:

5' CAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCT 3'

Праймер 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Праймер 3:

5' AGCTCCAGACTGCACCAGCTGAACCTG 3'

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:

5' TGGGTGAGGCAGGCGCCTGGGCAGGGAAGTCTGAG 3'

Праймер 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Праймер 3:

5' CTCAAGTCCCTGCCCAGGCGCCTGCCTCACCCA 3'

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:

Праймер 1:

5' CTCAGCAGGCTGCGGTCTGAGGACTCT 3'

Праймер 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Праймер 3:

5' AGAGTCCTCAGACCGCAGCCTGCTGAG 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 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 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' CAGATGACACAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTC 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 1E10VKhu і клонована до вектора експресії pAG 4622. Одержали генно-інженерну конструкцію 1E10VKhu-pAG4622.

Для експресії гуманізованого антитіла 1E10, клітини NS-0 трансфікували 1E10VHhu-pAN4604 та 1E10VKhu-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 MAb 1E10

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

Для рекомбінантного MAb 1E10, титрувальні мікропланшети сенсibilізували MAb 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 MAb 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 MAb C5 використовували як негативний контроль.

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

Fig.10: Специфічне зв'язування мишаного MAb P3 з химерним MAb 1E10. Шляхом ELISA випробували різні концентрації MAb 1E10 та MAb C5 (негативний контроль). Титраційні мікропланшети сенсibiliзували MAb P3 та MAb A3 (негативний контроль) і визначали специфічне зв'язування.

	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	R	S	G	P	Q	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S
VH P3	CAG	GTG	CAG	CTG	AAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGC	CTG	GTG	GCA	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	TCC	ATC	ACA	TGC	ACT	GTC	TCT
	CDR1																								
	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
	G	P	S	L	S	R	Y	S	V	H			M	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	S	M	L
VH P3	GGG	TTC	TCA	TTA	TCC	AGA	TAT	AGT	GTA	CAC			TGG	GTT	CGC	CAG	CCT	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG
	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	M	I	N				Q	Q	Q	S	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	R	L	S	I	S
VH P3	GGA	ATG	ATA	TGG				GGT	GGT	GGA	AGC	ACA	GAC	TAT	AAT	TCA	GCT	CTC	AAA	TCC	AGA	CTG	AGC	ATC	AGC
	CDR3																								
	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	b	c	d	e	f	101	102	103	104	105	106	107	108	109		
	A	R	S	G	V	R	N	G	R	A	Q	A	N	F	A	Y	M	G	Q	Q	T	L	V		
VH P3	GCC	AGA	AGT	GGG	GTA	CGA	GAG	GGA	AGG	GCC	CAG	GCC	TGG	TTT	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACT				
CTG	CTC																								

ΦΙΓ. 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	M	T	Q	S	H	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A	
VkP3	GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CAC	AAA	TTC	ATG	TCC	ACA	TCA	GTA	GGA	GAC	AGG	GTC	AGC	ATC	ACC	TGC	AAG	CCC	
	CDR1																									
	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	
	S	Q	G	D	V	S	T	A	V	A	N	Y	Q	Q	K	P	Q	Q	S	P	K	L	L	I	Y	S
VkP3	AGT	CAG	GAT	GTG	AGT	ACT	GCT	GTA	GCC	TGG	TAT	CAA	CAG	AAA	CCA	GGA	CAA	TCT	CCT	AAA	CTA	CTG	ATT	TAC	TCG	
	CDR2																									
	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	Y	N	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	
VkP3	GCA	TCC	TAC	CGG	TAC	ACT	GGA	GTC	CCT	GAT	CGC	TTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACG	GAT	TTC	ATC	ACC	ATC		
											CDR3															
	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	Q	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	H	Y	S	T	P	M	T	F	G	G	
VkP3	AGC	AGT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAA	CAT	TAT	AGT	ACT	CCG	TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	
	101	102	103	104																						
	G	T	K	L																						
VkP3	GGC	ACC	AAG	CTG																						

ΦΙΓ. 3

```

      10          20          30          40          50
VHP3   QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMI-WGGGSTDY
       X:..::: .:. .:. .:. .:. .:. .:. .:. .:. .:. .:. .:. .:. .^
huhoVH QVELVESGGGVVZPGRSRLRSCAASGFTFSNYAMHWVRQPPGKGLEWVAVISYBGBKYY
      10          20          30          40          50          60
      60          70          80          90         100         110
VHP3   NSALKSRLRSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARSGVREGRAQAWFAYWG-GTLV
       ...:..:..:..: ..:..:~.....:~::~: : : : : : ~:~:~:
huhoVH ABSVKGRPTISRDBSKBTLYLQMNSLRAESTAVYYCARDRPLYGBYRA-FNYWGQGTLV
      70          80          90         100         110

```

FIG. 4

```

10          20          30          40          50          60
VKP3  DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQOKPQOSPQLLIYSASSYRYTGVPD
      :: :::: . .: ::::: ::::: ::::: : : .X: ::::: ::::: :::::
huhvK DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDI - TYNWFPQQRPGQAPKVLIIYGASILETGVTS
          10          20          30          40          50

          70          80          90          100
VKP3  RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKL
      :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: . : ::::: X.
huhvK RFTGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQYDTLPLTFGGGTKV
          60          70          80          90          100

```

FIG. 5

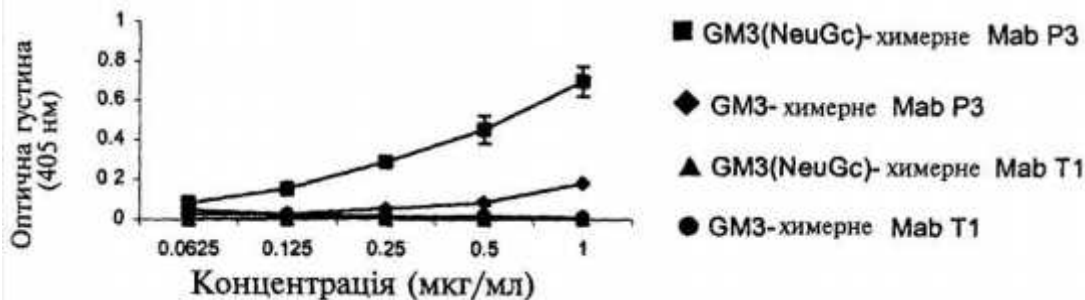


FIG. 6

	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
VH 1E10	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S
	CAG	GTT	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAA	CTG	GTA	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG	TTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT
	CDR1																								
	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
VH 1E10	Q	Y	T	F	T	S	Y	D	I	H			W	V	R	Q	R	P	E	Q	Q	L	S	W	I
	GGC	TAC	ACC	TTC	ACA	AGC	TAT	GAT	ATA	AAC			TGG	GTG	AGG	CAG	AGG	CCT	GAA	CAG	GGA	CTT	GAG	TGG	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
VH 1E10	Q	N	I	F	F			Q	D	Q	S	T	K	Y	N	E	K	F	K	Q	K	A	T	L	T
	GGA	TGG	ATT	TTT	CCT			GGA	GAT	GGT	AGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	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
VH 1E10	T	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	R	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C
	ACA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGG	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCT	GTC	TAT	TTC	TGT
	CDR3																								
	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	b	c	d	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111		
VH 1E10	A	R	E	D	Y	Y	D	M	S	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	T	L	T	V	
	GCA	AGA	GAA	GAC	TAC	TAT	GAT	AAC	TCC	TAC	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	CTC	ACA	GT		

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	
VklE10	D	I	Q	M	T	G	A	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	S	C	R	A
	GAT	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	ACT	ACA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCC	TCT	CTG	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	AGT	TGC	AGG	CCA	
	CDR1																									
	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
VklE10	S	Q							D	I	S	N	Y	L	N	N	W	Y	Q	Q	K	P	D	G	T	V
	AGT	CAG	GAC	ATT	AGC	AAT	TAT	TTA	AAC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GAT	OGA	ACT	GTT	
	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	
VklE10	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	
	AAA	CTC	CTG	ATC	TAC	TAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAC	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	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	
VklE10	D	Y	S	L	T	I	S	N	L	E	Q	E	D	I	A	T	Y	F	C	Q	Q	G	N	T	L	
	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATT	AGC	AAC	CTG	GAG	CAA	GAA	GAT	ATT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	AAT	ACG	CTT	
	CDR4																									
	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107											
VklE10	P			N	T	F	Q	G	G	T	K	L	E	S	K											
	CCG			TGG	ACG	TTC	GOT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA											

ΦΙΓ. 8

```

      10          20          30          40          50          60
VH1E10 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIIFPGDGSTKY
      :X: ::::: ::::::::::::::: :: . :.: : : : ::::: :... :
huhoVH QTQLVQSGAEVRKPGASVRVSCKASGITFIDSYIHWRQAPGHGLEWVGWINPNSSGGPNY
      10          20          30          40          50          60

      70          80          90         100         110
VH1E10 NEKFKGKATLTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARED-----YY--DNSYYFDYWQG
      :.:.:.: : : ::::: : : :.:.:.: : : :v : :^.: : :
huhoVH APRPQGRVTMTRDASFSTAYMDLRSRLSDDSAVFYCAKSDPFWSDYNYFDYSYTLDVWGQ
      70          80          90         100         110         120


VH1E10 GTTLTV
      :.:.:
huhoVH GTTVTV
```

FIG. 9

```

      10      20      30      40      50
VK1E10 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLWYQQKPDGTVKLLIYTTSSLHSGVP
      :::::.. :::::..X:::.. :::::.. :::::..
huhoVK DIQMTZSPSSLSASVGBRVTITCRASZTISSYLBWYZZKPGKAPBLLIYAASBLHSGVP
      10      20      30      40      50

      60      70      80      90     100
VK1E10 SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLESK
      :::::::::::..:::. ..:::.. . : :: :::X :
huhoVK SRFSGSGSGTBFTFTISSLZPZBFATYYCZSYSSPTTFGZGTRLZIK
      60      70      80      90     100

```

ΦΙΓ. 10

