

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам и к связывающим их белкам, способным связываться с Т-клетками, обнаруживающими специфические вариабельные бета-цепи, и в особенности с их субпопуляциями, представляющими экспрессию человеческих $V\beta$ 5,2 и/или 5,3, и $V\beta$ 8,1. Настоящее изобретение также относится к получению таких антител, к фармацевтическим составам, содержащим также антитела, и к терапевтическому применению этих антител, в частности, в лечении аутоиммунных заболеваний.

Т-клетки играют центральную роль в дифференциации и регуляции эффекторных механизмов в иммунной системе (Пол (Paul) и др., Наука, 195: 1293-1300, 1987 г.). Двойное распознавание антигена и главных молекул гистосовместимости Т-клеткой должно быть очень конкретным и регулироваться с абсолютной точностью, поскольку неадекватная иммунорегуляция способствует аутоиммунитету. В некоторых лабораториях исследовались заболевания, в которых прослеживалась неадекватность иммунорегуляции, такие как аутоиммунитет и некоторые формы иммунодефицита, и исследователи подчеркивали роль Т-клеток в патогенезе таких заболеваний.

Существует ряд ситуаций, в которых отмечается клональная или олигоклональная экспансия структуры рецептора конкретной Т-клетки. Наиболее очевидными примерами являются состояния злокачественных новообразований, которые приводят к Т-клеточной лейкемии или лимфоме. При состояниях Т-клеточных лейкозов (лейкемий) и лимфом рецептор Т-клетки функционирует как опухолеспецифический маркер, поскольку рецептор Т-клетки устойчиво реаранжирован и репрезентирован на поверхности клетки. Еще одной ситуацией, в которой усиливается роль структуры рецептора конкретной Т-клетки, является ситуация с реципиентом трансплантируемого органа, чьи Т-лимфоциты имеют рецепторы Т-клеток, делающие их агрессивными по отношению к молекулам МНС (главного комплекса гистосовместимости) донора, как, например, донора трансплантата костного мозга.

Что более важно, несколько групп исследователей отмечают избирательный характер использования V-гена рецептора антигена Т-клетки в определенных аутоиммунных состояниях. Например, Грюнвальд (Grunwald) и др. отмечают предпочтительную экспрессию генного продукта $V\alpha$ 2,3 в $CD4^+$ -клетках при бронхоальвеолярном лаваже в сравнении с лимфоцитами периферической крови пациентов с саркоидозом (Грюнвальд и др., Европейский иммунологический журнал, 22:129, 1992г.). При синдроме Кавасаки предпочтительная экспансия Т-клеток $V\beta$ 2 и $V\beta$ 8 отмечалась на начальной стадии заболевания (Абэ (Abe) и др., Труды Национальной академии наук США, 89:4066, 1992 г.).

Ревматоидный артрит также интенсивно изучался в этом плане. Некоторые исследователи отмечают предпочтительную экспансию субпопуляций Т-клеток, и среди них, в частности: Дерсимонян (DerSimonian) и др., Журнал экспериментальной медицины, 177:1623, 1993г. (предпочтительная экспансия Т-клеток, несущих $V\alpha$ 12,1, в $CD8^+$ Т-лимфоцитах периферической крови); Стаменкович (Stamenkovic) и др., Труды Национальной академии наук США, 85:1179, 1988г. (инфильтрующиеся через синовиальную мембрану Т-клетки, выращенные в IL2, были олигоклональными по результатам Саузерн-блоттинга); Пальяр (Paliard) и др., Наука, 253:34, 1991 г. (гипотеза об активизации суперантигеном $V\beta$ 14⁺ Т-клеток, включая и автореактивные Т-клетки, которые размножаются клонально и мигрируют в синовиальную жидкость пациентов с ревматоидным артритом); Хауэлл (Howell) и др., Труды Национальной академии наук США, 88:10921, 1991г. (отмечено, в частности, использование V-гена Т-клетки $V\beta$ 3, 14 и 17 в IL 2R⁺-клетках из синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом); Уэмацу (Uematsu) и др., Труды Национальной академии наук США, 88:8534, 1991 г. (показано использование V-гена олигоклональной Т-клетки в Т-клетках синовиальной жидкости одного больного РА); и Международная заявка № W090/06758 (указывающая на присутствие $V\beta$ 3, 9 и 10 у больных ревматоидным артритом (РА)).

Воспалительные заболевания кишечника также интенсивно изучаются. Несколько групп исследователей отмечают экспансию популяций Т-клеток или предпочтительное использование V-гена рецептора Т-клетки, в частности: Поснет (Posnett) и др., Журнал клинических исследований, 85:1770, 1990 г.; Спенсер (Spencer) и др., Журнал клинической патологии, 44:915, 1991 г.; Трейдосевич (Trejdosiwicz) и др., Клиническая и экспериментальная иммунология, 84:440, 1991 г.; и Ван Керкховен (Van Kerckhoven) и др., Журнал экспериментальной медицины, 175:57, 1992 г. Другие исследователи отмечают предпочтительное использование V-гена Т-клетки в *Mycobacterium leprae* (Ван Шоотен (Van Snooten) и др., Труды Национальной академии наук США, 89:11244, 1992 г.; Ванг (Wang) и др., Труды Национальной академии наук США, 90:188, 1993 г.).

У человека экспансия Т-клеток $V\beta$ 8,1 в очаге воспаления обнаружена в связи с несколькими аутоиммунными заболеваниями, включая болезнь Крона (Поснет и др., Журнал клинических исследований, 85:1770-1776, 1990г.), синдром Кавасаки (Абэ и др., Труды Национальной академии наук США, 89:4066-4070, 1992 г., и Абэ и др., Журнал экспериментальной медицины, 177:791-796, 1993 г.), и ревматоидный артрит (Бреннан (Brennan) и др., Клиническая и экспериментальная иммунология, 73:417-423, 1988 г.).

Рассеянный (многожественный) склероз (MS) - еще одно аутоиммунное заболевание, являющееся объектом интенсивного исследования. MS представляет собой вызванное расстройством иммунной системы заболевание, характеризующее инфильтрацией мононуклеаров в центральную нервную систему и ее демиелинизацией. Хотя патогенез MS неизвестен, на процесс болезни оказывает воздействие как генетические факторы, так и факторы окружающей среды. Основные факторы генетической предрасположенности включают в свое число отмеченную связь заболевания с конкретными гаплотипами МНС (главного комплекса гистосовместимости) класса II, в частности, HLA-DR21 и DQW1 (Терасаид (Terasaid) и др., Наука, 1933:1245-1247, 1976 г.; Хо (Ho) и др., Иммуногенетика, 15:509-517, 1982 г.; Шпильман (Spielman) и др., Эпидемиологическое обозрение, 4:45-65, 1982 г.; Фрэнсис (Francis) и др., Ланцет, 1:211, 1986г.; Элиан

(Elián) и др., Маркеры болезни, 5:89-99, 1987 г.; Урбан (Urban) и др., Клетка, 54:577-592, 1988 г.; Вандербанк (Vanderbank) и др., Природа, 341:541-544, 1989 г.; Хауэлл и др., Наука, 246:668-670, 1989 г.).

Было показано, что Т-клетки, выделенные из ликвора MS-больных, используют ограниченный набор V-генов. Демонстрация активированных *in vivo* специфических по MBP (основному миелinovому белку) Т-клеток у MS-больных, указывает на роль MBP-реактивных клеток в патогенезе болезни (Вучерпфениг (Wucherpfennig) и др., Наука, 248:1016-1019, 1990 г.). Когда использование V β рецептора Т-клетки (TCR) MBP-реактивных клеточных линий определяется посредством полимеразно-цепевой реакции (PCR) амплификации кДНК с помощью V β -праймеров TCR, обнаруживается предпочтительное использование ограниченного числа V β -генов (Вучерпфениг и др., (см. выше) - V β 17 и в меньшей степени V β 12 часто используются в распознавании области антигенной детерминанты MBP человеческого аутоантигена); Оксенберг (Oksenberg) и др., Природа, 362:68, 1993 г.). Результаты некоторых исследований также свидетельствуют об ограниченной экспрессии V α -гена рецептора Т-клеток при MS-поражениях мозга (Оксенберг и др., Природа, 345:344-346, 1990 г.). Анализ популяционной картины Т-клеток с использованием количественной PCR и окрашивания моноклонального антитела (mAt) показывает, что V β 5,2 и/или 5,3 преимущественно используются MBP-специфическими Т-клетками, выделенными у MS-больных, по сравнению с контрольной группой (Оксенберг и др., 1993 г., (см. выше) - реаранжированные V β 5,2-гены были обнаружены в мозговых тканях больных с определенным HLA-фенотипом), и Котзин (Kotzin) и др., Труды Национальной академии наук США, 88:9196, 1991 г. (смещение в сторону использования β -цепи, переменная область 5,2, и в меньшей степени V β 6,1 наблюдалось у MBP-специфических клонов от MS-больных).

В настоящее время в практике неизвестны эффективные пути лечения MS. (Гаррисоновские принципы лечения внутренних болезней, 12-ое издание, Вильсон и др., McGraw Hill Inc., 1991 г.). Усилия врачей направлены на уменьшение интенсивности обострений, предотвращение рецидивов или прогрессирования болезни, и на ослабление симптомов.

Однако экспрессия мышинового гена V β переменной области 8,2, как было выявлено, коррелирует с экспериментальным аллергическим (аутоиммунным) энцефаломиелитом (EAE), мышиную модель человеческого MS. Было продемонстрировано, что терапевтическое воздействие мышиным V β 8,2 специфическим mAt может и предотвращать, и ослаблять заболевание (Ача-Орбеа (Acha-Orbea) и др., Клетка, 54:263, 1988 г., и Урбан и др., Клетка, 54:577, 1988 г.). Таким образом, существует насущная потребность в создании антитела или "антителоподобной" молекулы, пригодной для лечения этого заболевания.

Антитела обычно содержат две тяжелые цепи, соединенные вместе дисульфидными связями, и легкую цепь, ассоциированную с N-концевой областью каждой тяжелой цепи. Каждая тяжелая цепь имеет своего N-терминального конца переменную область, сопровождаемую константной областью у другого ее конца. Переменные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающую рецепторную зону. Переменные области на легкой и тяжелых цепях имеют ту же общую структуру, и каждая область содержит основную структуру из четырех зон с относительно фиксированной последовательностью, соединенных тремя гиперпеременными участками (hv-участками). Четыре основные зоны принимают нечто подобное β -складчатой конформации, а hv-участки образуют петли, соединяющие β -складчатую конструкцию. hv-участки удерживаются в непосредственной близости (друг от друга) основными зонами и способствуют формированию антигенсвязывающей рецепторной зоны (сайта). hv-участки и основные зоны антител могут определяться обращением к номенклатуре Кэбота (Кэбот (Kabat) и др., "Белковые последовательности, представляющие иммунологический интерес", 1987 г., Департамент здравоохранения США, издательство Правительства США) при использовании рентген-кристаллографии, как это изложено в Международной заявке № WO91/09967.

С целью получения антитела, которое может иметь своей мишенью конкретный антиген, обычно используется методика Колера и Мильстайна (Kohler и др., Природа, 256:495-497, 1976 г.). Эта методика обычно предусматривает иммунизацию мыши антигеном, слияние клеток селезенки от иммунизированной мыши с мышинными миеломными клетками, и выбор из полученных таким образом гибридом одной или нескольких гибридом, которые секретируют моноклональное антитело (mAt), специфическое по отношению к антигену-мишени.

Было бы желательным использовать такие mAt в терапии. Однако такие mAt имеют по сути своей мышиную природу и поэтому сами являются антигенами по отношению к человеческому организму. Если такие mAt повторно вводятся в человеческий организм, иммунная система человека наращивает иммунную реакцию на мышиный mAt, нивелируя его действие.

Поэтому было предложено, первоначально Винтером (Winter) и его сотрудниками (см., например, Райхман (Reichmann) и др., Природа, 332:323-327, 1988 г., и Верхоэйн (Verhoeven) и др., Наука, 239:1534-1536, 1988 г.), чтобы hv-участки мышинового mAt трансплантировались в человеческую основную структуру с целью получения трансплантированного на hv-участок антитела, обладающего связывающими свойствами мышинового mAt и совместимостью человеческой структуры-акцептора.

Однако функциональные характеристики молекулы антитела зависят от ее трехмерной конфигурации, которая в свою очередь зависит от ее исходной аминокислотной последовательности. Изменение аминокислотной последовательности антитела может негативно сказаться на его активности. Аналогичным образом, фрагменты антитела могут не сохранять надлежащую трехмерную конфигурацию, необходимую для поддержания связывающей способности. Более того, изменение в кодирующей ДНК-последовательности антитела может сказываться на способности ДНК-содержащей клетки осуществлять экспрессию, секретирование или сборку антитела. Конкретные остатки, составляющие hv-участки, трудны в определении и не обязательно соответствуют всем остаткам в гиперпеременных участках, определяемым номенклату-

рой Кэбота. Имеются также остатки остоной структуры критического характера, роль которых важна в позиционировании hv-участков для их взаимодействия с антигеном, либо которые вовлечены во взаимодействие между тяжелыми и легкой цепями. Может быть необходимым изменить некоторые из структурных остатков таким образом, чтобы они соответствовали донорским остаткам в определенных позициях, придавая трансплантированному на hv-участок антителу менее "человеческий" характер.

В публикациях содержатся различные предложения по идентифицированию остатков hv-участка и человеческой остоной структуры, которые должны быть преобразованы в донорские остатки с целью получения применимого трансплантированного на hv-участок антитела (см. например, Квин (Queen) и др., WO90/07861; Керл (Kurre) и др., EP-A-0403153; Эдер (Adair) и др., WO91/09967; Квин и др., WO92/11018; и Бендиг (Bendig) и др., WO92/01568. Из этих публикаций можно сделать вывод, что задача получения работоспособного трансплантированного на hv-участок (CDR-трансплантированного) антитела в любом конкретном случае не имеет простого решения.

Несмотря на проблемы, связанные с получением специфического CDR-трансплантированного антитела, и предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения авторам удалось получить CDR-трансплантированное антитело, базирующееся на человеческих остовных областях и имеющее антигенсвязывающий сайт, специфический по переменным областям бета-цепи, присущим определенным субпопуляциям Т-клеток. Что удивительно, гуманизированные антитела по настоящему изобретению проявляют столь же хорошее и даже более высокое связывающее сродство по отношению к Т-клеткам-мишеням по сравнению с их мышиными прототипами. Заявляемые в настоящем документе антитела или их фрагменты обладают тем дополнительным преимуществом, что они менее иммуногенны, чем их мышиные прототипы, что таким образом снижает неблагоприятную реакцию пациента при их терапевтическом применении.

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, имеющим избирательную специфику связывания по отношению к определенным субпопуляциям Т-клеток, при этом указанные антитела обладают высокой чувствительностью в своем связывании с этими субпопуляциями и проявляют специфичность и аффинность в ходе этого связывания, сопоставимые, если даже не превосходящие эти же характеристики мАт-прототипов, являющихся источниками происхождения большей части их hv-участков. Настоящее изобретение также относится к способам получения таких гуманизированных антител с использованием нового кДНК-кодирования определенных гиперпеременных и остовных остатков и трансплантирования их в основные структуры человеческой тяжелой цепи и человеческой легкой цепи. Другие варианты осуществления настоящего изобретения относятся к фармацевтическим составам и терапевтическим методам, использующим эти антитела.

В одном из наиболее предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения мышиное мАт (16G8), которое осуществляет распознавание человеческого V β 8,1, гуманизировали CDR-трансплантированием определенных hv-участков и отобранных остатков остоной структуры от мышиного мАт в остовные структуры тяжелой цепи (KOL) и легкой цепи (REI). кДНК, кодирующие гуманизированные тяжелую (IgG₁) и легкую (K) цепи в векторах экспрессии клеток млекопитающих маркерами селекции Neo и DHFR, соответственно, были трансфицированы в DHFR-маркированную клеточную линию фибробласта китайского хомячка (CHO), с последующим отбором и амплификацией. Секретированное гуманизированное мАт, получившее обозначение "TM29", сохраняет специфичность по человеческому V β 8,1-РТК (рецептору Т-клетки), с аффинностью, сопоставимой с аффинностью мышиного мАт-прототипа (16G8). Антитела по настоящему изобретению показывают, что гуманизация анти-РТК антител может быть осуществлена при одновременном сохранении надлежащей специфичности и аффинности субпопуляций.

Другие варианты осуществления изобретения включают в себя применение этих гуманизированных антител в качестве терапевтического средства для лечения аутоиммунных заболеваний человека, в частности болезни Крона (гранулематоз кишечника).

В еще одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения мышиный мАт (TM23), который осуществляет распознавание человеческого V β 5,2 и 5,3, гуманизировали CDR-трансплантированием и остовные структуры тяжелой цепи (NEWM) и легкой цепи (REI). кДНК, кодирующие гуманизированные тяжелую (IgG₁) и легкую (K) цепи в векторах экспрессии клеток млекопитающих маркерами селекции Neo и DHFR, соответственно, были трансфицированы в DHFR-клеточную линию фибробласта китайского хомячка (CHO), с последующим отбором и амплификацией. Секретированное гуманизированное мАт, получившее обозначение "TM27", сохраняет специфичность по человеческому V β 5,2 и 5,3-РТК, с аффинностью, сопоставимой с, если не превосходящей, аффинностью мышиного мАт-прототипа (TM23). Другие варианты осуществления настоящего изобретения включают в себя применение TM27 в качестве терапевтического средства для лечения человеческого MS (рассеянный склероз).

Изобретение иллюстрируется чертежами, где фиг. 1 представляет различные переменные последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи для TM27, фиг. 2 представляет различные переменные последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи для TM29, фиг. 3 представляет результаты конкурентного анализа, сравнивающего TM27L/NSO и TM27L/CHO с 4H11, фиг. 4 представляет распределение Скэтчарда для эксперимента, представленного на фиг. 3.

Некоторые определения (термины), используемые в тексте описания настоящего изобретения, объясняются ниже.

Применительно к настоящей заявке, термин "антитело" используется для обозначения иммуноглобулинов (Ig) или любых их фрагментов, мономеров или димеров легкой цепи или тяжелой цепи, и антител одиночной цепи, таких как Fv-антитела одиночной цепи, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей соединены пептидным линкером, либо природным, либо полученным методами генной инженерии.

рии, при условии, что антитело включает в себя, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую рецепторную зону (сайт). Остаточная часть антитела не должна обязательно содержать только Ig-производные белковые последовательности. Например, может быть сконструирован ген, в котором ДНК-последовательность, кодирующая часть человеческой Ig-цепи, слита с ДНК-последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность полипептидного эффектора или репортерной группы. Таким образом, термин "антитело" охватывает гибридные антитела (см. ниже).

Используемый здесь термин "связывающий белок" относится к конструкции (генно-инженерной), имеющей специфическую аминокислотную последовательность, производную от антитела или комбинации антител и пространственно конфигурированную таким образом, чтобы была сформирована, по меньшей мере, одна антиген-связывающая рецепторная зона.

Аббревиатура "мАт" (в оригинале "mAb") используется для обозначения моноклонального антитела, продуцированного гибридомой или дериватной клеточной линией.

Термин "рекомбинантное антитело" используется для обозначения антитела, полученного способом, использующим методы генной инженерии.

Термин "CDR" или "гипервариабельный участок" (hv-участок) относится к тем частям вариабельных областей тяжелой цепи или легкой цепи антитела, которые соприкасаются друг с другом в трехмерном пространстве, образуя антиген-связывающую поверхность (сайт).

Термин "химерное антитело" используется для обозначения антитела, в котором вариабельные области, как целое, являются производными от антитела одного вида млекопитающих с последующим слиянием его с, по меньшей мере, одной константной областью от антитела иного вида млекопитающих.

Термин "CDR-трансплантированный" (трансплантированный на hv-участок) используется для обозначения антитела или его фрагментов, где CDR (hv-участки) являются в существенной степени производными от антитела одного вида млекопитающих, трансплантированными в вариабельные области основной структуры, в существенной степени производной от иного вида млекопитающих. Определенные отобранные аминокислоты в указанных областях основной структуры могут также быть получены от указанного первого вида млекопитающих.

Термин "гибридное антитело" используется для обозначения белка, содержащего, по меньшей мере, связывающую часть иммуноглобулина (Ig), прикрепленную пептидной связью к, по меньшей мере, части другого белка. Можно предположить, что некоторые специалисты в данной области могут также использовать термин "химерный" для обозначения таких конструкций, однако в настоящем описании такие конструкции определяются как гибридные антитела, а термин "химерные антитела" используется в определенном выше смысле.

Термин "гуманизированное антитело" используется для обозначения антитела, в котором, по меньшей мере, один, предпочтительно два или три из его CDR в одной или обеих вариабельных областях являются производными от антитела от указанного первого вида, при этом следует подразумевать, что сюда могут вовлекаться некоторые отобранные аминокислоты основной структуры в соединении с некоторыми гипервариабельными аминокислотными последовательностями, при этом остающиеся Ig-производные части антитела являются производными от одного или нескольких различных антител. Вариабельные области могут конструироваться методами генной инженерии, либо синтезом пептидов.

Понятие "вектор экспрессии" включает в себя векторы, способные осуществлять экспрессию содержащихся в них ДНК-последовательностей, т.е. кодирующие последовательности функционально связаны с другими последовательностями, способными осуществлять их экспрессию. Полезным, но не всегда необходимым (например, для клеток насекомых) элементом эффективного вектора экспрессии является маркерная (сигнальная) кодирующая последовательность, т.е. последовательность, кодирующая векторную последовательность, которая результирует в некотором фенотипическом свойстве (например, устойчивость к неомицину, устойчивость к метионинсульфоксимиду, или прототрофия по триптофону) клеток, содержащих белок, что позволяет легко идентифицировать такие клетки. В целом, "вектор экспрессии" имеет функциональное определение, и любая ДНК-последовательность, способная осуществлять экспрессию оговоренного ДНК-кода, охватывается этим термином, поскольку он применяется к заданной (оговоренной) последовательности. По состоянию на текущий момент такие векторы часто имеют форму плазмид. Таким образом термины "плазмида" и "вектор экспрессии" часто используются как синонимы. Однако настоящим изобретением намеренно охватываются также другие формы векторов экспрессии, которые осуществляют равноценные функции и которые, время от времени, привлекают внимание специалистов, включая ретровирусы, аденовирусы, системы *in vitro* (Баранов и др., Ген, 84:2:463, 1989 г.), и т.п.

Как указывалось ранее, ДНК-последовательности обретают экспрессию в клетках-хозяевах после того, как эти последовательности функционально соединяются с последовательностью контроля экспрессии (т.е. обретают позицию, обеспечивающую функционирование последней). Такие векторы экспрессии обычно воспроизводимы в организме-хозяине либо в форме эписом, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК организма-хозяина.

Термин "рекомбинантные клетки-хозяева" относится к клеткам, трансформированным векторами, сконструированными с использованием методов генной инженерии. Благодаря такой трансформации клетка-хозяин становится способной продуцировать нужный продукт в функциональных объемах, а не в меньших объемах, или, что более распространено, в объемах, не поддающихся выявлению, чего можно ожидать от клеток, не подвергшихся трансформации. Антитело и связывающие белки по настоящему изобретению могут продуцироваться рекомбинантной клеткой-хозяином в количествах, функционально достаточных для осуществления дополнительных экспериментальных исследований либо в коммерчески приемлемых объемах, например до 100 г и более.

В описании процессов выделения антител или их связывающих белков из рекомбинантных клеток-хозяев, термины "клетка" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо для обозначения источ-

ника происхождения антитела, если это четко не определено иным образом. Другими словами, выделение из "клеток" может подразумевать либо выделение из осажденных целых клеток, либо выделение из клеточной культуры, содержащей как среду, так и суспендированные клетки, либо, кроме этого, как это возможно в случае миеломных клеточных линий, из асцитной культуры.

Гуманизированные антитела или их связывающие протеины по настоящему изобретению имеют аминокислотные последовательности, у которых все или часть содержащихся в них CDR являются в существенной степени производными от моноклонального антитела, имеющего специфичность по заданной субпопуляции Т-клеток, и в особенности по субпопуляции V β 8,1 или субпопуляции V β 5,2/5,3. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения моноклональное антитело имеет мышинное происхождение. Остовная аминокислотная последовательность переменных областей антител или их фрагментов имеет в существенной степени человеческое происхождение в предпочтительных вариантах осуществления, и отсюда термин "гуманизированное антитело". Такая "гуманизация" рассматривается как полезная в снижении иммуногенности антитела при его терапевтическом применении для лечения больных людей. Для использования в рамках настоящего изобретения предпочтительны человеческие остовные области NEWM и KOL для тяжелой цепи, и человеческие остовные области REI для легкой цепи. Определенные оговоренные остатки остовой структуры сохраняются с мышинным, а не человеческим происхождением. Это считается необходимым для достижения надлежащего трехмерного конфигурирования молекулы и для увеличения таким образом связывающей специфичности и аффинности по оговоренной субпопуляции Т-клеток.

Любая часть гуманизированных антител (отсюда широкое толкование термина "антитело"), полученная в соответствии с излагаемыми методиками, находится в пределах объема настоящего изобретения при условии удерживания уровня связывающей специфичности и аффинности по заданной субпопуляции Т-клеток. Таким образом, связывающие белки, производные от указанных антител, безусловно лежат в пределах объема настоящего изобретения, равно как и другие фрагменты, сохраняющие оговоренные свойства, по меньшей мере, до уровня, приемлемого для их терапевтического использования, как это излагается ниже.

Специалист в данной области может осуществить тестирование связывающих свойств различных конструкций, выполненных в соответствии с излагаемыми здесь методиками, с помощью общепринятых анализов на связывание, выполняемых с конкретными Т-клетками или рецепторными белками Т-клеток, обнаруживающими заданную переменную область, которая становится мишенью. Например, могут быть выполнены конкурентно-связывающие анализы с мАт-прототипами, связываемыми с различными клеточными линиями, анализы Скэтчарда, и т.п., со сравнением результатов с результатами, полученными для мАт-прототипов. В качестве альтернативы можно обратиться к различным системам зоомоделей, таким, как описанные ниже, либо к клиническим экспериментальным исследованиям, для оценки терапевтической эффективности конструкций, выполненных в соответствии с настоящим изобретением, при этом подразумевается, что созданная генно-инженерная конструкция может быть весьма приемлемым терапевтическим средством, даже если ее картина связывания с антигеном-мишенью отличается от этого же показателя мАт-прототипа.

В наиболее предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность гуманизированного антитела или его связывающего белка содержит всю целиком или часть переменной легкой цепи, выбираемой из следующей группы:

TM 29 легкая цепь		
1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVNIYIWYQQTPGKAPKLLIYYT	
	50	
51	SNLAPGVPSRFGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQQFTSSPFTFGQG	
	100	
101	TKLQIT	106
TM 27 легкая цепь		
1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICSAQGISNVLNWYQQTPGKAPKLLIYY	
	50	
51	TSSLHSGVPSRFGSGSGTDYFTISLQPEDATYYCQQYSKLPRTFGQ	
	100	
101	GTKLQIT	
107		

индивидуально или в комбинации со всей целиком или с частью переменной тяжелой цепи, выбираемой из следующей группы:

TM 29 тяжелая цепь		
1	EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCSSSGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAY	50
51	ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNSKNTFLQMDSLRPEDTGVYFCARRG	
	100	

101 EGAMD YWQG GTPVT VSS

117

TM 27 тяжелая цепь
 1 QVQLQESG PGLVRPSQTL SLTCTVSGFSLTAYGVN WVRQPPGRGLEWLG M 50
 51 IWGDGNTD YNSALKSRVTMLKDT SKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV
 100
 101 TATLYAMD YWQG GSLVT VSS

120

Выбранные остатки основной структуры вблизи индивидуальных hv-участков важны для поддержания трехмерной конформации hv-участков (Фут и Винтер (Foot, Winter), Журнал молекулярной биологии, 224:487-499, 1992 г.). Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения были сконструированы модифицированные тяжелые цепи. В первой у остатков с 66 по 69 включительно и 73 мышиная последовательность Leu-Ser-Ile-Ser (66-69) и Asp (73) заменены человеческими аналогами.

В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения мышиные остатки валин и фенилаланин предусмотрены в позициях 78 и 79, или мышиный аргинин предусмотрен в позиции 92.

На фиг. 1 проиллюстрированы эти замещения; hv-участки показаны жирным шрифтом и подчеркнуты. Эти предпочтительные конструкции антител (включая их связывающие белки) связываются с V β 5,2/5,3.

Другие предпочтительные антитела и их связывающие белки предусматриваются здесь модифицированием тяжелых цепей у остатков 23 и 24. В этих позициях замещается мышиная аналоговая последовательность Ala-. Другие конструкции показывают, что остаток 75 может представлять собой мышиный пролиновый остаток, либо что остатки 88, 89 и 91 могут представлять собой аланин, метионин или тирозин, соответственно. Эти конструкции антител и их связывающих белков связываются с V β 8,1 T-клеток и более подробно проиллюстрированы на фиг. 2.

Особенно предпочтительными в использовании здесь являются CDR-трансплантированные антитела, состоящие по существу из легкой цепи TM27 в комбинации с тяжелой цепью TM27, где остаток 48 - это мышиный лейцин, либо мышиный изолейцин. Также весьма предпочтительны CDR-трансплантированные антитела, состоящие по существу из легкой цепи TM29 в комбинации с тяжелой цепью TM29.

Гуманизированные антитела или их связывающие белки по настоящему изобретению могут быть получены различными методами, с экспрессией в трансфецированных клетках, таких как дрожжи, клетки насекомых, предпочтительно CHO или миеломные клетки. Наиболее предпочтительна в качестве клетки-хозяина CHO-клетка (фибробласт китайского хомячка).

Для конструирования CDR-трансплантированного антитела или его связывающего белка в соответствии с настоящим изобретением вначале необходимо выяснить последовательность вариационной области антитела, имеющего желаемые связывающие свойства. Подходящими источниками клеток для таких ДНК-последовательностей являются птицы, млекопитающие и иные позвоночные - цыплята, мыши, крысы и кролики, предпочтительно мыши. Последовательности вариационной области (V_H и V_L) могут быть определены по кДНК тяжелой и легкой цепей, синтезированных из соответствующей мРНК методами, хорошо известными в практике. Гипервариационные участки могут затем определяться с использованием метода Кэбота (см. выше). hv-участки могут определяться структурным анализом с помощью рентгенкристаллографии или методов молекулярного моделирования. Затем могут конструироваться составные hv-участки, содержащие все остатки, соответствующие гипервариационным участкам, наряду с некоторыми выбранными остатками от остовных областей. Полученные составные hv-участки могут затем переноситься как "антиген-связывающий сайт", тогда как остающаяся часть антитела, при необходимости сконструировать законченный Ig, будет включать в себя константные области тяжелой и легкой цепей и остатки остовой структуры. Эти последние фрагменты могут базироваться на человеческих антителах различных классов.

Константные области могут выбираться с наличием нужных эффекторных функций, соответствующих назначению сконструированного таким образом антитела. Например, изотипы IgG₁ и IgG₃ человеческого IgG эффективны для фиксации комплемента и опосредованного клетками лизиса. Для других целей могут быть более приемлемыми другие изотипы, например IgG₂ и IgG₄, либо другие классы, например IgM и IgE.

Для лечения людей особенно важно использовать человеческие изотипы, чтобы свести к минимуму антиглобулиновую реакцию в ходе терапевтического воздействия. ДНК-последовательности константных областей человека, предпочтительно в совокупной связи с их остовными областями с вариационными доменами, могут быть получены в соответствии с общеизвестными методиками. В качестве примера можно привести комплекс CAMPATH 1H фирмы Burroughs Wellcome Ltd.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения предлагаются определенные CDR-трансплантированные антитела, содержащие заданные перестройки в остовой области человеческого типа (другими словами, за пределами hv-участков вариационных областей), что приводит к формированию CDR-трансплантированного антитела с удовлетворительным связывающим сродством (аффинностью). Такое связывающее сродство составляет предпочтительно от примерно 10⁻⁵M до примерно 10⁻¹²M, и, более предпочтительно, по меньшей мере примерно 10⁻⁸M. Наиболее предпочти-

тельно, связывающее сродство примерно равно или превышает связывающее сродство антитела-прототипа (в предпочтительных вариантах это антитело-прототип имеет мышинное происхождение).

При конструировании CDR-трансплантированных антител по настоящему изобретению V_H и/или V_L сегменты гена могут быть перестроены мутагенезом. Специалисту в данной области должно быть понятно, что различные другие нуклеотиды, осуществляющие кодирование аминокислотных остатков или последовательностей, содержащихся в Fc-фрагменте или других участках антитела, могут быть перестроены сходным образом (см., например, Международную заявку № PCT/US89/00297).

К обычным методикам относятся присоединение, делеция или неконсервативное замещение ограниченного числа различных нуклеотидов, либо консервативное замещение многих нуклеотидов, при условии сохранения надлежащей рамки считывания.

Замещение, делеция, инсерции или любые их комбинации могут использоваться для получения конечной конструкции. Поскольку имеется 64 возможных кодонных последовательности, но лишь двадцать известных аминокислот, генетический код имеет деградиационный характер в том смысле, что различные кодоны могут продуцировать одну и ту же аминокислоту. Однако код является абсолютно точным для каждой аминокислоты. Таким образом, для каждой аминокислоты существует, по меньшей мере, один кодон, т.е. каждый кодон обеспечивает продуцирование единичной аминокислоты, и никакой другой. Очевидно, что в ходе трансляции должна сохраняться надлежащая рамка считывания для получения соответствующей (заданной) аминокислотной последовательности в окончательно оформленном полипептиде.

Методики присоединения, деления или замещения на предварительно заданных аминокислотных сайтах, имеющих известную последовательность, хорошо известны в практике. Примерами таких методик являются сайтнаправленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов, и PCR.

Сайтнаправленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов по сути своей предусматривает гибридизацию олигонуклеотида, осуществляющего кодирование для нужной мутации, с единичной цепью ДНК, содержащей область, подлежащую мутационной перестройке, и использование указанной единичной цепи в качестве матрицы для удлинения олигонуклеотида с целью получения цепи, содержащей заданную мутацию. Эта методика, в различных модификациях, описана Цоллером и Смитом (Zoller; Smith), Исследования нуклеиновых кислот, 10:6487, 1982 г.; Норрисом (Norris) и др., Исследования нуклеиновых кислот, 11:5103, 1983 г.; Цоллером и Смитом, ДНК, 3:479, 1984г.; Крамером (Kramer) и др., Исследования нуклеиновых кислот, 10:6475, 1982 г.

PCR (полимеразная реакция синтеза цепи) по сути своей предусматривает экспоненциальную амплификацию ДНК *in vitro* с использованием последовательно-специфических олигонуклеотидов. Эти олигонуклеотиды могут включать в себя, при необходимости, перестройки последовательности. PCR-методика описана Маллисом и Фолуной (Mullis; Faloona), Методы ферментологии, 155:335, 1987 г. Примеры мутагенеза с использованием PCR описаны Хигучи (Higuchi) и др., Исследования нуклеиновых кислот, 16:7351, 1988 г.; Хо (Ho) и др., Ген, 77:51, 1989 г.; Хо и др., Генно-инженерная гибридизация гена-ограничителя без использования рестриктазы: сплайсинг гена перекрывающим удлинением; Хортоном (Horton) и др., Ген, 77:61, 1989 г.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению, способные осуществлять полную экспрессию нужных антител или их связывающих белков, могут формироваться из ряда различных полинуклеотидов (геномная ДНК, кДНК, РНК или синтетические олигонуклеотиды). В настоящее время считается предпочтительным, чтобы олигонуклеотидная последовательность содержала слияние кДНК с геномной ДНК. Полинуклеотидная последовательность может кодировать различные Ig-компоненты (например, V, J, D и C-области). Они могут быть сконструированы множеством различных методик. Соединение соответствующих геномных и кДНК-последовательностей сегодня является наиболее распространенной методикой, но могут также использоваться кДНК-последовательности (см. Европейский патент № 0239400, и Райхман (Reichmann) и др., Природа, 332:323, 1988 г.).

Некоторые приемлемые векторы экспрессии и клетки-хозяева описаны в патенте США № 4816567.

Описанные здесь векторы и методы пригодны для использования в клетках-хозяевах в широком спектре прокариотных и эукариотных организмов.

В целом, конечно, прокариоты являются предпочтительными для клонирования ДНК-последовательностей в конструировании векторов, пригодных к использованию в настоящем изобретении. Например, особенно приемлемы клонирующие векторы различных плазмид *E. coli*, такие как векторы Bluescript M13 фирмы Stratagene, Сан-Диего, Калифорния; pUC19c, № VB0026 в Генном банке; pBR322 (описан ниже), и т.п. Эти примеры, конечно, следует рассматривать в иллюстративном, а не в ограничивающем плане.

Прокариоты также могут использоваться для экспрессии. Штаммы упомянутой *E. coli*, *bacilli* - такие, как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие, как *Salmonella typhimurium* или *Serratia marcescens* и различные виды *Pseudomonas* могут использоваться для этой цели.

В целом, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, полученные от видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются совместно с этими клетками-хозяевами. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипный отбор в трансформированных клетках. Например, *E. coli* обычно трансформируют, используя один из многих дериватов pBR322, а плазмиды, полученная от pBR322-вида *E. coli* (Боливар (Bolivar) и др., Ген, 2:95, 1977 г.), содержит гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину и, таким образом, представляет удобное средство идентификации трансформированных клеток. Плазмиды pBR322, ее "потомки", или иные микробные плазмиды могут также содержать, либо быть модифицированы для содержания промоторов, которые могут использоваться микроорганизмом для экспрессии рекомбинантных белков. Эти промоторы, широко используемые в конструировании рекомбинантной ДНК, включают в свое

число лактозо-промоторные системы (Чанг (Chang) и др., Природа, 275:615, 1978г.; Итакюра (Itakura) и др., Наука, 198:1056, 1978 г.; Гедель (Goedell) и др., Природа, 281:544, 1979 г.) и триптофан-промоторные системы (Гедель и др., Исследование нуклеиновых кислот, 8:4057, 1980 г., и Европейский патент № 0036776). Хотя указанные системы широко используются в практике, становятся известны и начинают использоваться другие микробные промоторы, и в печати появляются подробности, относящиеся к их нуклеотидным последовательностям, что дает возможность специалисту осуществлять их функциональное лигирование в плазмидные векторы (Зибенлист (Siebenlist) и др., Клетка, 20:269, 1980 г.).

В дополнение к прокариотам могут также использоваться эукариотные микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные кулинарные дрожжи, наиболее широко используются среди эукариотных микроорганизмов, хотя в широком наличии имеется ряд других штаммов. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно широко используется, например, плазида YRp7 (Стинчком (Stinchcomb) и др., Природа, 282:39, 1979г.; Кингсмен (Kingsman) и др., Ген, 7:141. 1979г.; Тишемпер (Tschemper) и др., Ген, 19:157, 1980г.). Эта плазида уже содержит ген *trp1* (триптофан1), который служит маркером селекции для мутантного штамма дрожжей, неспособного расти в триптофане, см., например ATCC № 44076 или PER4-1 (Джоунз (Jones), Генетика, 8:85:12, 1977г.). Присутствие *trp1*-инсерции как характеристика генома дрожжевой клетки-хозяина в этом случае служит эффективным фактором для определения трансформации по росту в отсутствие триптофана.

К удобным промоторным последовательностям в дрожжевых векторах относятся промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как эналаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза, и глюкокиназа (Хесс (Hess) и др., Журнал современной ферментологии, 7:149, 1968 г.; Холенд (Holland) и др., Биохимия, 17:4900, 1978 г.). При конструировании соответствующих плазмид-носителей экспрессии концевые последовательности, связанные с этими генами, также лигируются в вектор экспрессии 3' последовательности, которая должна получить экспрессию для обеспечения полиаденилирования мРНК и терминации. К другим промоторам, дополнительным преимуществом которых является контроль транскрипции условиями роста, относятся промоторные области по алкогольдегидрогеназе 2, изоцитохром С, кислая фосфатаза, деградативные ферменты, ассоциируемые с азотным метаболизмом, и вышеупомянутая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа - фермент, ответственный за утилизацию мальтозы и галактозы. Пригодным является любой плазмидный вектор, содержащий совместимый с дрожжами промотор, начало репликации и терминационные последовательности.

В дополнение к микроорганизмам, в качестве клеток-хозяев могут также использоваться культуры клеток, полученные от многоклеточных организмов. В принципе, для работы годится любая клеточная культура, получена ли она от позвоночного или от беспозвоночного организма. Однако на сегодняшний день наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало за последние годы обычной технологией (Круз и Патерсон (Kruse; Patterson), Тканевая культура, Academic Press, 1973 г.). Примерами таких полезных линий клеток-хозяев являются клеточные линии VERO, HeLa, CHO, W138, BHK, COS-7, MDCK и миелома и группоспецифическая миелома (от фирмы Celltech, Слоу, Великобритания). Векторы экспрессии для таких клеток могут включать в себя (если необходимо) соответствующее начало репликации, а также промотор, располагающийся перед геном, подлежащим экспрессии, наряду с любыми необходимыми сайтами связывания рибосом, сигнал для сплайсинга РНК, сайт полиаденилирования, и последовательности терминации транскрипции.

Для использования в клетках млекопитающих контрольные функции на векторах экспрессии зачастую обеспечиваются вирусным материалом. Например, широко используемые промоторы получают из человеческого цитомегаловируса (HCMV), вируса полиомы, аденовируса 2, и, наиболее часто, из вакуолизирующего обезьяньего вируса (ОВ-40). Ранние и поздние промоторы из вируса ОВ-40 особенно полезны, поскольку оба они легко получаются из вируса в форме фрагмента, который также содержит ОВ-40-вирусное начало репликации (Файерс (Fiers) и др., Природа, 273:113, 1978 г.). Кроме того, также возможно, а зачастую и желательно, использовать промотор или контрольную последовательность, обычно ассоциируемую с желаемой генной последовательностью, при условии, что такие контрольные последовательности совместимы с системой клеток-хозяев.

Начало репликации может быть представлено либо конструкцией самого вектора, включающей в себя экзогенный ориджин репликации, такой, какой может быть получен из ОВ-40 или иного вирусного источника (например, вируса полиомы, аденовируса, VSV или BPV), либо может быть предоставлен механизмом хромосомной репликации клетки-хозяина. Если вектор интегрируется в хромосому клетки-хозяина, этой хромосоме часто бывает достаточно.

Векторы, содержащие ДНК-сегменты, представляющие интерес (например, кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяин хорошо известными методами, которые варьируются в зависимости от типа клеточного материала. Например, трансфекция хлоридом кальция обычно используется для прокариотных клеток, тогда как для других клеток-хозяев могут использоваться обработка фосфатом кальция, липофекция или электропорация (Маниатис (Maniatis) и др., Молекулярное клонирование: Руководство для лабораторий, 2-е издание, Cold Spring Harbor Press, 1990 г.).

Обретя экспрессию, конструкции по настоящему изобретению могут быть очищены в соответствии со стандартными методиками, такими как фракционирование сульфатом аммония, колонки иммобилизации (аффинности), хроматография на колонке и гель-электрофорез (Скоупс (Scopes), Очистка белков, Springer Verlag, Нью-Йорк, 1982 г.). Связывающее средство получивших таким образом экспрессию конструкций мо-

жет быть определено с помощью известных в практике методик, как это будет более полно проиллюстрировано в разделе "Примеры" настоящего описания.

Для фармацевтического использования предпочтительны в существенной степени чистые CDR-трансплантированные антитела, имеющие гомогенность в пределах, по меньшей мере, 90-95%, и наиболее предпочтительно 98-99% и выше. После очистки, частичной или до необходимого уровня гомогенности, CDR-трансплантированные антитела могут далее использоваться в диагностической и в терапевтической практике (в том числе и экстракорпорально), либо в разработке и осуществлении аналитических методов, в иммунофлуоресцентном окрашивании, и т.п. (Лефковит и Пернис (Lefkovite; Pernis), Иммунологические методы, т.т. 1 и 2, Academic Press, Нью-Йорк, 1979 и 1981 г.).

CDR-трансплантированные антитела или их связывающие белки по настоящему изобретению обычно находят применение в лечении нарушений, опосредованных деятельностью Т-клеток. Например, типичными болезненными состояниями, в лечении которых применимы указанные продукты, являются аутоиммунные заболевания, такие как диабет типа II, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона, и миастения гравис.

Терапевтическое использование Т-клеточных антител по настоящему изобретению исходит из уровня корреляции между специфическим иммунопатологическим заболеванием и предпочтительной формой экспрессии конкретного антиген-рецепторного V-гена Т-клетки или расширенным использованием конкретного V-гена рецептора антигена Т-клетки. Антиген-рецепторные V-области Т-клеток полезны отчасти потому, что становится возможным регулировать иммунную реакцию у индивидуального пациента путем специфического терапевтического воздействия с использованием рецептора антигена Т-клетки. В частности, подтверждается, что наличие или экспрессия локуса конкретной варибельной области соотносится с конкретными иммунопатологиями.

Определяя конкретные локусы V-области, ассоциируемые с конкретным иммунопатологическим заболеванием, можно воздействовать на пациента, подавляя приступ Т-клетками, несущими конкретную V-область.

Термин "лечение" ("воздействие", "терапевтическое воздействие") в рамках настоящего изобретения включает в себя ситуации "предотвращения", "подавления" или "лечения" заболевания. "Предотвращение" подразумевает назначение защитных составов до индуцирования заболевания. Так, например, в зоомодели, ЕАЕ, успешное применение (назначение) защитного состава перед инъектированием энцефалитогена, индуцирующего заболевание, приводит к "предотвращению" заболевания.

"Подавление" подразумевает назначение состава после события индуцирования, но до клинического проявления заболевания. Вновь прибегая к примеру ЕАЕ (см. выше), успешное применение защитного состава после инъектирования энцефалитогена, но до клинического проявления неврологических симптомов, представляет собой "подавление" заболевания.

"Лечение" подразумевает назначение защитного состава после клинического проявления заболевания. В примере с ЕАЕ, успешное применение защитного состава после инъектирования энцефалитогена и после развития клинических признаков представляет собой "лечение" заболевания.

Существуют зоомоделирующие системы, которые могут использоваться для определения эффективности антител или их связывающих белков в профилактике или лечении таких заболеваний. Системная красная волчанка (СКВ) тестируется на восприимчивых мышах, как описано Найтом (Knight) и др., Журнал экспериментальной медицины, 147:1653, 1978г., и Райнерстеном (Reinersten) и др., Новый английский медицинский журнал, 299:515, 1978 г. Миастения гравис (MG) тестируется на самках мышей SJL/J индуцированием болезни растворимым белком АChR от другого вида, как описано Линдстромом (Lindstrom) и др., Современная иммунология, 42:233-284, 1988 г. Артрит индуцируется у восприимчивой линии мышей инъектированием коллагена типа II, как описано Стюартом (Stewart) и др., Ежегодный иммунологический сборник, 42:233-284, 1984 г. Адьювантный артрит индуцируется у восприимчивых крыс инъектированным микробактериального жидкого белка, как описано Ван Эденом (Van Eden) и др., Природа, 331:171-173, 1988 г. Тиреоидит индуцируется у мышей введением тиреоблбулина, как описано Мароном (Maron) и др., Журнал экспериментальной медицины, 152:1115-1120, 1980 г. Инсулинзависимый сахарный диабет (IDDM) возникает естественно, либо может индуцироваться у определенных линий мышей, таких как описанные Канасавой (Kanazawa) и др., Диабетология, 27:113, 1984 г. ЕАЕ у мышей и крыс служит в качестве модели для MS у человека. В этой модели болезнь демиелинизации индуцируется введением основного миелинового белка, как описано Патерсоном (Paterson), Пособие по иммунопатологии, Grune and Stratton, Нью-Йорк, 1986г., стр.стр. 179-213; Макфарлин (McFarlin) и др., Наука, 179:478-480, 1973 г.; и Сато (Satoh) и др., Иммунологический журнал, 138:179-184, 1987 г.

CDR-трансплантированные антитела или их связывающие белки по настоящему изобретению могут также использоваться в комбинации с другими антителами, в особенности с МАТ, взаимодействующими с другими маркерами на человеческих клетках, ответственных за заболевания. Например, соответствующие Т-клеточные маркеры могут включать в свое число те, которые сгруппированы в так называемые "Кластеры дифференциации", как это было сформулировано Первой международной группой по дифференциации лейкоцитов (Бернхард (Bernhard) и др., Типирование лейкоцитов, Springer Verlag, Нью-Йорк, 1984 г.).

В целом, CDR-трансплантированные антитела и их связывающие белки по настоящему изобретению могут использоваться в очищенном виде вместе с фармакологически приемлемыми носителями. Обычно такие носители включают в свое число водные или спирто-водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Парентеральные носители включают в свое число раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия и лактат-декстрозу Рингера. Приемлемые физиологически допустимые адьюванты, при необходимости поддержания комплекса в

суспендированном состоянии, могут быть выбраны из числа загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

К носителям для внутривенного введения относятся жидкостные и питательные наполнители и электролитные наполнители, например на основе декстрозы Рингера. Могут присутствовать также консерванты и другие добавки, такие как антимикробные добавки, антиоксиданты, хелатообразователи и инертные газы (Мэк (Mask), Ремингтоновская фармацевтика. 16-е издание, 1982 г.).

Конструкции по настоящему изобретению могут использоваться в форме отдельно применяемых составов, либо в совокупности с другими средствами. К их числу могут принадлежать различные иммуно-терапевтические медикаментозные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические составы могут представлять собой "коктейли" из различных цитотоксических или других средств в совокупности с CDR-трансплантированными антителами или их связывающими белками, либо даже комбинации конструкций по настоящему изобретению и CDR-трансплантированных антител, имеющих иные характеристики специфичности.

Способ введения фармацевтического состава по настоящему изобретению может быть любым из широко известных специалистам-практикам в данной области. Для терапевтического применения, включая без каких-либо ограничений иммунотерапию, CDR-трансплантированные антитела и их связывающие белки по настоящему изобретению могут вводиться любому пациенту в соответствии со стандартными методами. Введение может осуществляться любым приемлемым путем, например, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интраперитонеально, либо также, соответствующим образом, прямым вливанием с помощью катетера. Дозировка и частота введения зависят от возраста, пола и общего состояния пациента, параллельного применения других медикаментозных препаратов, противопоказаний и иных параметров, которые надлежит учитывать лечащему врачу.

Конструкции по настоящему изобретению могут подвергаться лиофилизации с целью хранения, и восстанавливаться в соответствующем носителе перед использованием. Эта методика, как показывает практика, эффективна в работе с обычными иммуноглобулинами, и поэтому можно использовать известные в практике технологические приемы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области должно быть очевидным, что лиофилизация и последующее восстановление могут приводить к различной степени потерям активности антитела (например, для обычных иммуноглобулинов, IgM-антитела имеют тенденцию к большей потере активности, чем IgG-антитела), и что уровни использования могут нуждаться в корректировке для компенсации таких потерь.

Составы, содержащие CDR-трансплантированные антитела по настоящему изобретению или "коктейль" из них, могут назначаться для профилактического и/или терапевтического курсов лечения. В определенных ситуациях терапевтического применения количество, адекватное для осуществления, по меньшей мере, частичного угнетения, ослабления, модуляции, уничтожения или достижения какого-либо иного измеримого параметра, в отношении популяции заранее намеченных клеток, определяется как "терапевтически эффективная доза". Непосредственные объемы, необходимые для соблюдения этой дозировки, зависят от тяжести заболевания и от общего состояния иммунной системы самого пациента, но в целом лежат в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг CDR-трансплантированного антитела или его связывающего белка на килограмм веса тела, при этом наиболее широко используемая дозировка составляет от 0,05 до 2,0 мг/кг. Для профилактического применения составы, содержащие конструкции по настоящему изобретению или "коктейли" из них, могут также назначаться в аналогичной или слегка уменьшенной дозировке.

Состав, содержащий конструкцию по настоящему изобретению, может использоваться в ситуациях профилактического или терапевтического воздействия для содействия в изменении, инактивации, уничтожения или удаления заранее определенной Т-клеточной популяции-мишени у млекопитающих.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения описанные здесь конструкции могут использоваться экстракорпорально или *in vitro* избирательно, чтобы уничтожить, истощить или иным способом эффективно удалять клеточную популяцию-мишень из гетерогенного собрания клеток. Кровь млекопитающего может экстракорпорально соединяться с CDR-трансплантированными антителами или их связывающими белками, благодаря чему нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови, которая может быть возвращена млекопитающему в соответствии со стандартными методами.

В дополнение к терапевтическому использованию конструкции по настоящему изобретению могут найти использование в иных целях. В одном из вариантов осуществления изобретения антитела или их связывающие белки полезны в исследовательской работе. Связывающие белки Т-клеточного рецептора или антитела по настоящему изобретению также полезны в структурных и функциональных исследованиях, относящихся к Т-клеточному рецептору. Наряду с работой в качестве субстратов или связывающих доменов для специфических форм Т-клеточных рецепторов эти конструкции антител могут служить в качестве инструментов для мониторинга структурных исследований для аппроксимации естественной конфигурации различных сегментов Т-клеточного рецептора. В еще одном варианте осуществления изобретения Т-клеточные антитела или их связывающие белки могут использоваться в качестве диагностических зондов. В одном специфическом варианте осуществления конструкции по настоящему изобретению могут использоваться в определении объема или присутствия определенной субпопуляции Т-клеточной V-области в биологическом препарате. Один такой анализ описан Риттерсхаусом (Rittershaus) - см. Международную заявку № WO92/08981, опубликованную 26.05.92 под названием "Терапевтические и диагностические методы, использующие все поверхностные антигены лейкоцита". Как таковое, настоящее изобретение содействует осуществлению методов диагностирования иммунопатологического заболевания, такого как MS, основывающихся на выявлении специфической субпопуляции Т-клеточного антиген-рецептора в биологическом препарате.

CDR-трансплантирование антитела или их связывающие белки могут быть помечены в соответствии с известными в практике методиками. Настоящие конструкции также пригодны для других *in vivo*-целей. Например, они могут быть использованы для избирательной клеточной обработки клеток периферической крови, когда желательно удалить только Т-лимфоциты-мишени, либо аналогичным образом в клеточной культуре для удаления ненужных Т-лимфоцитов.

Нижеследующие примеры предназначены для более конкретного изложения отдельных аспектов настоящего изобретения, но не должны истолковываться в ограничивающем плане.

Пример 1. TM.27 - Краткое изложение работы.

1. Мыши линии BALB/c были иммунизированы Т-клеточной лейкемией, клеточная линия HPB-ALL (один раз интраперитонеально и дважды внутривенно).

2. Клетки селезенки этих мышей собирали и сливали с мышинной миеломой, иммортализирующей клеточную линию P3X63AG8.653.

3. Отбор пригодных клонов был выполнен в ГАТ-среде.

4. Скрининг отобранных таким образом клонов по соответствующему связыванию был выполнен иммунопреципитацией меченных радиоактивным изотопом HPB-ALL.

5. Субклонирование было осуществлено конечным разведением.

6. Специфичность проверялась PBL-стимуляцией и CD3-модуляционным анализом.

7. Гибридома, секретирующая соответствующее антитело, получила обозначение 4Н 11.

8. Из этого клона была получена РНК и выделена мРНК. Была подготовлена кДНК к этой мРНК.

9. Полученную кДНК секвенировали с проверкой точности.

10. Изолированные кДНК (Н и К) клонировали в векторы M13.

11. Выбранные человеческие остовные области (структуры) вводились посредством мутагенеза, как проиллюстрировано в примере 2.

12. Гуманизированные антитела (~1 мг каждого) очищали от NSO-трансфектантов для предварительной оценки.

Были подготовлены пять различных ТМ:

TM27L: с лейцином в позиции 48 тяжелой цепи.

TM27I: с изолейцином в позиции 48 тяжелой цепи.

TM27.1: с изменением FS на VF (78-79).

TM27.2: с изменением VTML/T на LSIS/N (67-70/73).

TM27.3: с изменением V на R (92).

Подробное изложение эксперимента.

Резюме.

Целью данного проекта была гуманизация враждебного человеческой ткани мышинного ТМ23 - моноклонального антитела Т-клеточного рецептора (TCR) V β 5,2/5,3, и формирование гуманизированного антитела, обеспечивающего экспрессию клеточной линии, пригодной для дальнейшего процесса. Этим гуманизированным анти-TCR V β 5,2/5,3 моноклональное антитело представляет собой конструкцию ТМ27.

Мышиное антитело.

Гибридома 4Н11 была получена слиянием мышинной миеломной клеточной линии, P3X63AG8.653, с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-клеточной лейкемией клеточной линии HPB-ALL. Данная гибридома даст экспрессию моноклонального антитела ТМ23 со специфичностью по человеческому TCR V β 5,2 и 5,3. Изотип - IgG_{2a}/каппа.

Гуманизация.

кДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи ТМ23, выделяли из 4Н11 кДНК-библиотеки, сконструированной с использованием мышинного IgG_{2a} и праймеров с каппа-специфическими 3'-концами. Выделенные кДНК-клоны подтверждали ДНК-секвенированием и секвенированием внутренних аминокислот. CDR (гипервариабельные участки, hv-участки) тяжелой и легкой цепей идентифицировали в соответствии с результатами анализа первичной остовной структуры мышинных последовательностей. ДНК-фрагменты (L-лидерный, V-вариабельный, (D)-многообразия, J-стыковой) выделяли с помощью PCR и клонировали в векторы экспрессии CHO-клеток, pTCSLC_h DHFR и pTCSLCg1NeoAp, которые несли ДНК с человеческой каппа- и IgG_{2a} константными областями, соответственно, для экспрессии химерного антитела "мышь V/человек C".

На основе сравнения аминокислотных последовательностей, выведенных из кДНК-клонов, было выявлено, что тяжелая цепь ТМ23 принадлежит к подгруппе IB по Кэботу. Была определена принадлежность последовательности V κ к подгруппе V κ V по Кэботу. Поэтому для гуманизации тяжелой и легкой цепей, соответственно, были выбраны человеческие остовные структуры NEWM и REI. Рearанжированные V(D)J-фрагменты (за исключением части 5'V и 3'J) клонировали в векторы M13, которые несли лидерную и интронную последовательности в геномной конфигурации с целью формирования полных геномных L-V(D)J-конструкций.

Экспрессия миеломы.

После конструирования CDR-трансплантированных V(D)J-областей посредством мутагенеза ДНК-фрагменты клонировали в миеломные векторы экспрессии, которые несли константные области человеческой каппа и IgG₁, соответственно. Были сконструированы пять гуманизированных тяжелых цепей с различными мутациями. Каждую из пяти конструкций тяжелых цепей котрансфецировали с гуманизированной легкой цепью в NSO-миеломную клеточную линию. Гуманизированные антитела очищали от культурного супернатанта из размножившихся позитивных по человеческому IgG₁/к трансфектантов для оценки. Результаты анализа свидетельствовали о том, что ТМ27L, с минимальным объемом мышинных аминокислотных последовательностей, окрашивает V β 5,3 Т-клетки так же хорошо, как и другие гуманизированные вер-

сии, если не лучше. TM27L было поэтому отобрано для дальнейшей проработки и получило обозначение TM27.

Экспрессия CHO-клеток.

Лидерные и V-области тяжелой и легкой цепей TM27 выделяли из миеломных конструкций с помощью PCR для клонирования в кДНК-конфигурации в системы CHO-клеточной экспрессии, рTCSLCg1NeoAp (тяжелая цепь) и рTCSLC_κDHFR (легкая цепь), как описано выше. CHO-клеточные трансфектанты отбирали, и клетки, позитивные по человеческому IgG₁/κ, клонировали. Один из наиболее продуктивных продуцентов, TV27L-662-35, размножали для создания банка клеточного материала и производства небольших количеств гуманизированного Ат. CHO-экспрессия антитела TM27 сохраняет характерные признаки на протяжении всего цикла проработки и сравнимо в этом плане с миеломными клеточными линиями и родительским TM23. Одновременно с изложенным, CHO-клеточные клоны были подвергнуты амплификации и клонированию для увеличения экспрессии антитела и демонстрации пригодности штамма для улучшения продуктивности.

Подробное описание.

HPB-ALL-иммунизация мышей линии BALB/c.

Иммунопреципитат βF1 (враждебный к человеческой ткани мАт константной области Т-клеточного рецептора β-цепи) человеческих HPB-ALL-клеток Т-клеточной лейкемии (3x10⁷), полученных от д-ра Майкла Бреннера (Гарвардский медицинский институт), смешивали с полным адьювантом Фройнда (Freund) и интраперитонеально инъецировали мыши линии BALB/c. После 5 недель мышь получала бустерные инъекции из 3x10⁷ клеток в физиологическом растворе в течение 3-х последовательных дней, вначале интраперитонеально (i.p.), а затем дважды внутривенно (i.v.).

Слияние клеток селезенки с P3X63AG8.653.

Слияние осуществляли с применением устоявшихся методик спустя три дня после заключительной бустерной i.v. инъекции. Клетки селезенки, в пятикратном избытке, сливали с клетками P6X63AG8.653 (мышинная миелома, Ig-несекретирующая линия, полученная от линии BALB/c; ATCC CRL 1580), используя 50% полиэтиленгликоль 1500 (BDH, Дарсет, Англия).

ГАТ - отбор слитых клеток.

Слитые клетки высевали в 96-луночные планшеты с 2x10⁵ BALB/c-тимоцитов в качестве питающей среды и селектировали в среде RPMI-1640, содержащей 15% FBS (фетальной телячьей сыворотки) и ГАТ (6 ммоль гипоксантина, 50 ммоль аминоптерина и 2 ммоль тимидина). Клетки инкубировали в увлажненном воздухе с 5% CO₂ при 37°C.

Скрининг гибридомы.

По истечении 13-14 дней лунки с признаками роста подвергали скринингу твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) и иммунопреципитацией HPB-ALL-клеток, меченых радиоизотопом ¹²⁵I. В условиях иммунопреципитации CD3-молекулы диссоциируют с α и β цепями TCR. Гибридомы, которые взаимодействовали с HPB-ALL, переносились в матрасы T-75 для последующего клонирования.

Клонирование представляющих интерес гибридом.

Гибридомы со специфичностью по TCAR (Т-клеточному рецептору антигена) HPB-ALL клонировали конечным разведением. Клетки высевали в 96-луночные планшеты для культуры с двукратным серийным разведением плотности клеточной популяции в диапазоне от 2 до 0,015 клетки/лунку. Колонию, обнаруживающую наилучший рост, отбирали для двукратного повторения вышеизложенной процедуры. После этих двух дополнительных циклов селекции одну из конечных колоний, 4H11, идентифицировали. Моноклональное антитело (мАт), получившее экспрессию через иммунопреципитированные клоном 4H11 молекулы, идентичные α и β TCR-цепям, преципитовало вместе с мАт βF1, частью β-цепи TCR. Результат позволил предположить, что это мАт имеет специфичность по β-цепи TCR, получившим экспрессию в Т-клетках HPB-ALL. Для удобства это антитело получило обозначение TM23.

Исследование различных характеристик моноклонального антитела и гибридомы 4H11, TM23.

Изотипирование моноклональных антител TM23 осуществлялось с использованием имеющихся в практике тест-наборов (Zymed, Сан Франциско, Калифорния). Результаты показали, что это мышинный изо-тип IgG_{2a}/κ.

Для подтверждения анти-TCR реактивности мАт TM23 его тестировали на его способность со-модулировать CD3-молекулу с поверхности HPB-ALL-клеток. Предшествующие исследования показали, что мАт либо α-цепи, либо β-цепи TCR могут со-модулировать CD3 с поверхности клетки, когда клетки проходят преинкубацию с анти-TCR моноклональными антителами. Когда HPB-ALL-клетки были предварительно инкубированы с TM23, наблюдалось заметное снижение реактивности по отношению к анти-CD3 мАт Leu-4 по сравнению с реактивностью Leu-4, наблюдаемой в необработанных клетках.

Нормальный человеческий PBL (лимфоцит периферической крови) тестировали на реактивность по TM23. От 1,6% до 3% тестированных Т-клеток PBL взаимодействовали с TM23. Этот результат типичен в ряду результатов, полученных с несколькими другими мАт, которые, как было выявлено, взаимодействуют со специфическими детерминантами V-областей.

С целью определения, связывается ли TM23 с той же самой детерминантой, что и 1C1 (мАт, взаимодействующее с подсемействами человеческих Vp 5.2 и 5.3; см. Бойлстон (Boylston) и др., Иммунологический журнал, 137:741, 1986г.), исследовалась способность одного мАт блокировать связывание другого мАт. Когда HPB-ALL-клетки вначале инкубировали с TM23, связывание меченного флуоресцином 1C1 ингибировалось. В свою очередь, когда клетки вначале инкубировались с 1C1, ингибировалось связывание по

TM23. Эти результаты наводят на мысль о том, что TM23 и 1C1 связываются с теми же самыми или расположенными в непосредственной близости друг от друга детерминантами.

Для дополнительной оценки того, имеют ли TM23 и 1C1 сходные характеристики реактивности, были получены линии PBL для стимуляции другими мАт. Каждую линию затем тестировали на реактивность по каждому мАт. Когда линия PBL стимулировалась TM23, и 1C1 и 4H11 взаимодействовали со сходным в процентном отношении количеством клеток. Это же верно и для линии PBL, стимулированной 1C1.

Выращивание клеточной культуры 4H11.

Клон TM23.1 7-31-91 (4H11) выращивали и размножали в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 1% фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина и 12,5 ммоль глутамина.

Подготовка кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи TM23.

Примерно 10^6 клеток 4H11 изолировали центрифугированием и один раз промывали ледяным холодным 3ФР. Общую РНК подготавливали, используя набор для выделения общей РНК фирмы "Promega" (кат. № Z5110). Поли (A)⁺ РНК подготавливали, используя систему для выделения мРНК фирмы "Promega" (кат. № Z5200). Мышиный IgG_{2a} и к-специфическую библиотеку кДНК подготавливали, используя набор "BRL SuperScript" фирмы BRL (кат. № 82Y8SA) с IgG_{2a}-праймером

```
5' ATATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTTAGT
3'
и к - праймером
5' ATATGCGGCCGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAAT
3'
```

Эти два праймера содержат сайты рестрикционного фермента Xho I и последовательности, комплиментарные по отношению к 3'-концам мышиного IgG_{2a} и к-кодирующих областей, соответственно. кДНК клонировали в плазмиду pSPORT, прилагаемую к набору, и трансформировали в E. coli DH5a-компетентные клетки методом электропорации. Плазмидные клоны, несущие вставки правильного размера, отбирали для секвенирования.

Идентифицирование кДНК-клонов, кодирующий тяжелую и легкую цепи TM23.

Мини-препарат плазмидной ДНК со вставками правильного размера (клоны легкой цепи №№ 1, 6, 19, 20, 25 и 26; клоны тяжелой цепи №№ 4, 9, 11, 15, 22 и 34) подвергали секвенированию двухцепочечной ДНК, используя набор для секвенирования фирмы "USB" (кат. № 70770), содержащим T7-праймер 5' к ДНК-вставкам. Последовательности клонов легкой цепи №№ 6, 20 и 25, и клон тяжелой цепи № 34 свидетельствовали о том, что они представляют собой мышиные Ig-клоны. Клоны №№ 6, 20 и 25 легкой цепи имели идентичные последовательности, а № 6 содержал точковую мутацию и представлял собой нефункциональный клон. Клоны №№ 20 и 34 секвенировали, используя специфические по константной области праймеры:

к-праймер

5' GACATTGATGTCTTTGGGGTAGAAGTTGTT 3'

и Ig_{2a} -праймер

5' GGTCACCTGGCTCAGGGAAATAACCCTTGAC 3'

Результаты вновь подтверждали, что клон № 3 представляет собой нефункциональный клон, и показывали, что клоны №№ 20 и 34 представляют собой правильные клоны для легкой и тяжелой цепей, соответственно. кДНК и аминокислотные последовательности, выведенные из этих двух клонов, представлены на фиг. 1.

Из-за N-концевого блокирования, микросеквенирование белков выполняли на фрагментах CNBr-фрагментированных пептидов, изолированных из полиакриламидных гелей. Аминокислотные последовательности внутренних V-областей, полученные в этом процессе, сопоставимы с результатами, полученными от кДНК-последовательностей. Эти результаты подтверждали, что выделенные кДНК-клоны представляли собой клоны, кодирующие тяжелую и легкую цепи TM23.

hν-участки тяжелой и легкой цепей идентифицировали по методике Кэбота и Ву (см. выше), и эти участки выделены и подчеркнуты на фиг. 1.

PCR-изолирование ДНК V-области тяжелой и легкой цепей и секвенирование ДНК.

Получение химерного антитела TM23.

Выделение мышиных VH ДНК и VK ДНК.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей TM23 адаптировали для инсерции в векторы экспрессии. ДНК-последовательность, кодирующую по мышиному VH TM23, амплифицировали из TM23MuVH.MuIgG_{2a} посредством PCR, используя олигонуклеотидные праймеры - праймер VH1BACK

(5' AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3')

который содержит сайт для рестрикционного фермента PstI, и праймер VH1FOR

```
5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG 3'
```

который сходным образом содержит сайт BstEII. M заменяет C или A, S заменяет C или G, R заменяет A или G, и W заменяет A или T. Эти сайты были таким образом внедрены у концов 5' и 3', соответственно, TM23VH-ДНК. Амплифицированную ДНК разрезали ферментами PstI и BstEII и лигировали в

двухцепочечную репликативную форму (RF) ДНК вектора M13 VNPCR1, разрезанного теми же ферментами.

M13 VNPCR1 представляет собой вектор фага M13, производный от M13-HuVNHP (Джоунз и др., Природа, 321:522-525, 1986г.), и содержит иммунолобулиновый промотор, сигнальную последовательность и соответствующие сплайсинг-сигнальные сайты (Орланди (Orlandi) и др., Труды Национальной академии наук США, 86:3833-3837, 1989 г.).

Лигированную ДНК трансформировали в компетентный штамм TG1 E. coli (K12, $\Delta(lac-pro)$, supE, thi, hsd D5 [F' tra D36, pro^{A+B+}, lacO^q, lacZ M15]).

Одноцепочечную ДНК подготавливали из полученных бляшек рекомбинантного фага.

ДНК-последовательность, кодирующую по мышинному VK TM23, амплифицировали из TM23MuVK.MuCK посредством PCR, используя олигонуклеотидные праймеры - праймер VK1BACK

5' GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCA 3',

содержащий сайт PvuII, и праймер VK1FOR

5' GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC 3',

содержащий сходным образом сайт BglII в совокупности с двумя взаимоперекрывающимися внутренними праймерами, предназначенными для удаления сайта HindIII hv-участка 3, олиго 943

5' CCCAGGAAGTTTACTATACTG 3'

и олиго 944

5' CAGTATAGTAACTTCCTCGG 3'

(Хортон (Horton) и др., 1990 г.). Сайты PvuII и BglII таким образом внедрялись у концов 5' и 3' VK ДНК TM23. Амплифицированную ДНК переваривали с PvuII и BglII и лигировали в M13 VKPCR1, разрезанный PvuII и BglII. Ферменты BglII и BclI разрезают ДНК, продуцируя совместимые "липкие" концы, которые могут лигироваться друг с другом.

M13VKPCR1 содержит такие же промотор-сигнальную последовательность и сплайсинг-сигнальные сайты, что и M13 VNPCR1 (Орландо и др., 1989 г.).

Лигированную ДНК трансформировали в штамм TG1 E. coli, и одноцепочечную ДНК подготавливали из полученных бляшек рекомбинантного фага.

Были получены PCR-продукты правильного размера, 359 пар оснований (п/о) для VN и 288 п/о для VK. VN-ДНК вставляли в вектор M13VNPCR1, получая M13 TM23MuVN. VK-ДНК вставляли в вектор M13VKPCR1, получая M13 TM23MuVK.

Подтверждение ДНК-последовательностей.

Было подтверждено, что в ходе процесса были клонированы верные ДНК-последовательности и что в ходе PCR не возникали никакие ложные мутации. Последовательность одноцепочечной ДНК фага M13 всей состоящей из 823 п/о VN-области, включающей в себя промотор, сигнальную последовательность, сплайсинг-сигнальные сайты и нетранспируемые последовательности 5' и 3', получали дидеокси-способом (Зангер (Sanger) и др., 1977 г.), используя ДНК-полимеразу T7, или секвеназу.

Последовательность одноцепочечной ДНК фага M13 всей состоящей из 630 п/о VK-области, включающей в себя промотор, сигнальную последовательность, сплайсинг-сигнальные сайты и нетранспируемые последовательности 5' и 3', получали дидеокси-способом, как указано выше.

Определялись ДНК-клоны с нужной последовательностью для TM23 VN, адаптированные для вставки в вектор экспрессии. Один из них, № 2, отбирали для дальнейшей работы. Введение требуемых сайтов рестрикции, необходимых для инсерции VN в вектор экспрессии, приводило к одному изменению аминокислоты у N-окончания: замене лизина (K) в позиции 5 глутамином (G), и к одной замене у C-окончания: серии (S) в позиции 108 на треонин (T).

Определялись ДНК-клоны с нужной последовательностью для TM23 VK, адаптированные для вставки в вектор экспрессии. Один из них, № 4, отбирали для дальнейшей работы. Аминокислотная последовательность hv-участка 3 не изменялась в результате удаления сайта HindIII, но введение требуемых сайтов рестрикции, необходимых для инсерции VK в вектор экспрессии, приводило к трем аминокислотным изменениям у N-окончания: метионина (M) в позиции 4 на лейцин (L), треонина (T) в позиции 7 на серин (S), и треонина (T) в позиции 8 на пролин (P); и к одному изменению у C-окончания: валина (V) в позиции 105 на глутамин (G), благодаря использованному праймеру.

Клонирование ДНК-фрагментов V-области в вектор M13.

На этом этапе выполняли перенос клонированной мышинной вариабельной области в векторы экспрессии, содержащие гены человеческой константной области, для последующей экспрессии антитела в клетках млекопитающих.

Отбор IgG-изотипа для гуманизации.

Человеческий IgG₁-изотип был выбран для TM27 по следующим основаниям:

1. IgG₁ обладает способностью служить посредником как ADCC (антителозависимой клеточной цитотоксичности), так и CDC (комплементзависимой цитотоксичности). Поэтому он может быть более эффективен в обратном регулировании Т-клеток V β 5,2/5,3;

2. IgG₁ чаще используется в гуманизации Ат.

Отбор человеческой основной структуры для CDR-трансплантата.

Получение гуманизированного антитела TM23.

Конструирование последовательностей вариабельной области гуманизированного TM23.

На этом этапе осуществлялся отбор последовательностей человеческой основной структуры для получения hv-участков TM23 и определялись важные мышинные остатки, которые должны быть замещены в человеческой основной структуре. С помощью компьютера сравнивались аминокислотные последовательности VH и VK TM23 как с известными последовательностями других мышинных антител, так и с VH и VK последовательностями человеческих антител.

Была задействована программа ALIGN фирмы DNASTER Ltd, Лондон, W13, 9BL, Великобритания, на компьютере Compaq 386. Эта программа выстраивает рядом две белковые последовательности, используя методы Липмана-Пирсона (Lipman-Pearson) и Нидлмана-Вунша (Needleman-Wunsch). Вначале, метод Липмана-Пирсона определяет области наилучшей гомологии. Затем метод Нидлмана-Вунша обеспечивает окончательное выстраивание последовательностей.

Полученные выстроенные последовательности затем исследовали, обращая особое внимание на такие факторы, как длина hv-участков и остатков, по предположению играющих критическую роль в определении конформации hv-участков, например, позиций 71 и 94 и остатков, располагающихся в непосредственной близости от hv-участков (Трамонтано (Tramontano) и др., 1990 г.; Фут и Винтер, 1992 г.).

Сравнение согласованных последовательностей по номенклатуре Кэбота позволило отнести мышинное VH TM23 к подгруппе VK V по Кэботу. В основных структурах TM23 нет аминокислотных последовательностей, являющихся необычными для этих подгрупп.

Человеческие антитела NEWM и REI послужили источниками последовательностей основной структуры для VH и VK, соответственно. Для VH, в дополнение к hv-участкам, использовались мышинные остатки в позициях 27-30 включительно и 71. Предполагается, что эти остатки основной структуры играют важную роль в определении конформации hv-участков (Фут и Винтер, 1992 г.). Остаток 71 может фиксировать относительное расположение hv-участка 1 и hv-участка 2 в соответствии с тем, какая из боковых цепей имеется в наличии - крупная (лизин или аргинин) или меньшая (валин или аргинин) (Трамонтано и др., 1990 г.). Поэтому валин 71 в NEWM VH был замещен лизином в TM23 VH. Остатки 27-30 образуют часть скорее структурной, нежели гипервариабельной, антигенсвязывающей петли, как определено Чотиа и Леск (Chothia; Lesk), 1987 г. Остатки 47-49 основной структуры также могут быть важны для структуры антитела (Фут и Винтер, 1992 г.). Поэтому были сконструированы две альтернативные гуманизированные тяжелые цепи: одна с изолейцином (I) в позиции 48, как в NEWM; и одна с лейцином (L) в позиции 48 таким образом, что сохранялись остатки 47-49 мышинного VH. Сравнение последовательности мышинного VH с гуманизированной версией представлено в примере 2.

Никаких изменений не выполнялось в человеческой основной структуре REI, отобранной для VK TM23. Сравнение последовательности мышинного VK с гуманизированной версией также представлено в примере 2.

Описание вектора экспрессии pTCSNeo млекопитающих.

Плазмида pTCSNeo содержит специфический сайт клонирования XhoI, в который осуществляется инсерция представляющих интерес генов. Транскрипция вставленных генов задействуется регулярными последовательностями, состоящими из энхансера SV40 в прямом направлении после Ad2 MLP (главный поздний промотор аденовируса 2). Сам Ad2 MLP располагается в прямом направлении после состоящей из трех частей лидерной последовательности аденовируса. Вставленный ген фланкируется сигналом полиаденилирования от мышинного иммуноглобулина каппа (Igk) у конца 3'. Селективная принадлежность к млекопитающим подтверждается геном устойчивости к неомицину (Neo^r). Плазмида также содержит бактериальный репликатор и ген β-лактомазы (Amp^r).

Конструирование вектора экспрессии pTCSLNeo.

Два комплементарных олигонуклеотида, имеющие соответственно последовательности:

не имеющую смысла –

5' CGACATCGATGATATCGAATTCGCGGCCGCCAGCTGGGGCCCTCTAGAC

3'

и имеющую смысл –

5' CGAGTCTAGAGGGCCCCAGCTGGCGGCCCGCAATTCGATATCATCGATG

3'

регибридизировали и лигировали с pTCSNeo, переваренным (гидролизированным) с XhoI и наполненным dT. Полученная плазмида, pTCSLNeo, с полилинкером, состоящим из множественных рестрикционноферментных сайтов в ориентации 5'Xho/XbaI/ApaI/PvuII/NotI/EcoRI/EcoRV/ClaI3' удобна для инсерции гена, представляющего интерес для экспрессии. Ген neo^r может также быть заменен на другой ген-маркер селекции.

Конструирование вектора экспрессии pTCSLDHFR*.

Neo^r ген в pTCSLNeo удаляли перевариванием с рестрикционным ферментом HindIII и BamHI и заново лигировали с мышинной мутантной DHFR (дигидрофолатредуктазой) - ферментом DHFR*-гена, сформированным HindIII и BamHI-перевариванием плазмиды pSV2-DHFR*, полученной от д-ра Пола Берга (Paul Berg) (Биохимическое отделение медицинского колледжа Стенфордского университета).

Описание плазмиды pSV184 H-Neo/DNS-VkCk.

Плазмида pSV184 ΔH-Neo/DNS-V_κC_κ (получена от д-ра Ли Херценберга, медицинский колледж Стенфордского университета - см. Диссертацию Джеффри Дэнгла (Jeffery Dangi), стр. 48-67) представляет собой химерную конструкцию из мышиных V и человеческих C областей, в которой генный сегмент V-J области реаранжированной κ-цепи, изолированный из специфической по дансилхлориду мышиной гибридомы, сливали с человеческим геномным C_κ-фрагментом (pSV184 ΔH-Neo-C_κ).

Выделение константной области человеческой каппа-цепи с помощью PCR-метода.

Используя непереваренную плазмиду pSV184ΔH-Neo/DNS-V_κC_κ (pSVH_κ), которая содержит константную область человеческой каппа-цепи, выполнили PCR с двумя праймерами (прямым и обратным) для изоляции указанной константной области. Олигомеры (праймеры) были получены от фирмы "Oregon". Реактивы для реакции PCR были взяты из набора ДНК-амплификационных реактивов "GeneAmp" с "AmpliTaq" ("Perkin-Elmer Cetus"). PCR-реакции осуществлялись при трех различных концентрациях Mg²⁺. Аликвоты PCR-продуктов анализировали на 1%-ном агарозном геле. Был выбран продукт от первой пробы Mg²⁺ (концентрация 1,5 ммоль). Праймеры, фланкирующие C-область, были рассчитаны на содержание рестрикционноферментных сайтов для целей клонирования. Таким образом, амплифицированную ДНК переваривали с EcoRI (у конца 3'). Сайт у конца 5' (PvuII) не переваривали. Переваренный ДНК-фрагмент затем прогоняли на 1%-ном агарозном геле, и зону в 300 п/о эксцизировали. ДНК экстрагировали из геля, и небольшую аликвоту анализировали на 1%-ном агарозном геле для определения качества и оценки количества. Полоска в 300 п/о оказалась чистой, и общее количество ДНК по оценке составило ~140 нг.

Клонирование константной области человеческой каппа-цепи в вектор pBS KS⁺ и секвенирование.

EcoRI-переваренный ДНК-фрагмент константной области человеческой каппа-цепи вставляли в вектор pBS KS⁺, переваренный с SmaI и EcoRI, используя ДНК-лигазу T4. Эту лигационную смесь использовали для трансформирования компетентных клеток DH5α E. coli. Были собраны единичные колонии, которые использовались для инокуляции 24 суспендированных культур. От каждой из культур подготавливали ДНК. Каждая проба ДНК переваривалась с PvuII (конец 5' C_κ) и EcoRI (конец 3' C_κ) и анализировалась на 2%-ном агарозном геле. Из-за сложности в отделении полос нижнего ранга (300 п/о) пробы ДНК переваривали только с PvuII. После анализа на 2%-ном агарозном геле 19 из 24 проб оказались верными для C_κ-инсерции. Пробы №№ 1-5 (из 19 правильных проб) были выбраны для секвенирования, с использованием праймеров T7 и T3 (последовательности в векторе, фланкирующие вставку). Другие реактивы для секвенирования были взяты из набора "Секвенса, версия 2.0 (USB)". Проба № 5 показала наличие правильной последовательности для константной области человеческой каппа-цепи.

Клонирование константной области человеческой каппа-цепи в вектор экспрессии млекопитающих pTCSLDHFR* для преобразования его в pTCSLC_κDHFR*.

Константную область человеческой каппа-цепи изолировали от вектора pBS KS (проба № 5), используя рестрикционные ферменты PvuII и EcoRI. Однако из-за уже знакомой проблемы в отделении полос второй перевар был выполнен с конструкцией pBS/человеческая C_κ. Второе переваривание задействовало EcoRI и XbaI (расположенный 5' к сайту PvuII) и дало фрагмент примерно в 300 п/о. Этот фрагмент затем очищали гелем и подвергали PvuII-перевариванию с целью удаления остающихся небольших фрагментов вектора у конца 5' C_κ. Этот конечный фрагмент очищали гелем и анализировали на 1%-ном агарозном геле с целью определения качества и оценки количества. Было выяснено, что C_κ-ДНК представляет собой чистую полосу с ~280 п/о и с общим количеством по оценке примерно 135 нг.

Из-за наличия трех EcoRI-сайтов в векторе экспрессии, pTCSLDHFR*, было определено, что клонирование лучше всего осуществлять в сайт PvuII. Поскольку C_κ-ДНК была подготовлена перевариванием с PvuII-EcoRI, для EcoRI-конца выполняли репарацию (формируя "тупой" конец), используя фрагмент Кленова (Klenow). Восстановленную C_κ-ДНК с "тупым" концом лигировали с вектором pTCSLDHFR*, переваренным с PvuII и обработанным фосфатазой (с использованием фосфатазы, полученной из тонкого кишечника телят). Эту лигационную смесь использовали для трансформирования компетентных DH5α-клеток E. coli. Единичные колонии собирали и использовали для инокуляции 24 суспендированных культур. Из каждой была подготовлена ДНК. Все ДНК-пробы переваривали с PvuII и HindII и анализировали на 1%-ном агарозном геле. Было определено, что пять проб из двадцати четырех содержали C_κ-вставку в правильной ориентации. Проба № 7 была отобрана для дальнейшей работы.

Замещение мутантного DHFR*-гена DHFR-геном "дикого" типа.

Для экспрессии вектора pTCSLC_κDHFR* в (dhfr^r)DUX B11-клетках CHO, DHFR*-ген заменяли DHFR-геном. ДНК от pTCSLC_κDHFR*-пробы № 7, а также pSV2-DHFR (плазмиду, полученную от д-ра Пола Берга, см. выше), переваривали с рестрикционными ферментами HindII и BglII, изолируя соответствующие генные фрагменты. По результатам анализа было определено, что дополнительный BglII-сайт в векторе pTCSLC_κDHFR* также удалял часть сайта polyA, что могло бы мешать векторной функции. Поэтому переваривание повторяли, используя HindIII и BamHI. Часть (DHFR*)pTCSLC_κ вектора обрабатывали фосфатазой. Затем оба изолированных фрагмента (pTCSLC_κ и DHFR) очищали гелем и анализировали на 1%-ном агарозном геле для определения качества и оценки количества. Обе полосы по результатам анализа были чистыми и, по оценке, имели сходную концентрацию - примерно 40-50 нг/мл. DHFR-ген лигировали с pTCSLC_κ-вектором, используя ДНК-лигазу T4. Лигационную смесь использовали для трансформирования компетентных DH5α-клеток E. coli. Единичные колонии собирали и использовали для инокуляции 24 суспендированных культур. Из каждой приготавливали ДНК. ДНК анализировали перевариванием с рестрикционными ферментами HindIII и BamHI. 23 из 24 культур давали правильные полосы, указывающие на инсерцию DHFR-гена в вектор pTCSLC_κ. Пробу № 22 отбирали для дальнейшего использования.

Мутагенез in vitro с целью конструирования CDR-трансплантированных V-областей с человеческой остовной структурой.

Гуманизированный VH-ген конструировали сайтнаправленным мутагенезом VHPCR1-матрицы M13, которая содержит синтетический VH-ген с остовными областями человеческого миеломного белка NEWM

(см. Джоунз и др., 1986г.). Одноцепочечную матричную ДНК готовили из VHPCR1 M13, выращенного в RZ1032-штамме *E. coli* (dut⁻, ung⁻) таким образом, что матричная ДНК содержала урацил вместо тимина. Были синтезированы мутагенные олигонуклеотидные праймеры для кодирования hv-участок TM23 и приблизительно 15 п/о абсолютно согласующихся фланкирующих последовательностей по обе стороны. Если CDR-последовательность TM23 соответствовала матричной последовательности, использовались более короткие олигонуклеотидные праймеры. В качестве праймеров использовались:

```
CDR1
    5'          TGGCTGTCTCACCCAGTTTACACCATAGGCGGTTAATGAGAAGCCAGACACGG
        3',
CDR2
    5'          TGCTGGTGTCTTTTCAGCATTGTCACTCTGGATTTGAGAGCTGAATTATAGTCT
        GTATTTCCATCACCCCATATCATTCCAAT7CCACTCAAGACC
        3',
и CDR3
    5'          CCAGTAGTCCATAGCATAGAGGGTAGCCGTAACCCTATCTCTTGCACAATAATAG
    3'.
```

Олигонуклеотидный праймер для CDR (hv-участка) удлиняли у конца 3', чтобы включить в него требуемые остатки в позициях 27-30. Для CDR2 подготавливали смешанный олигонуклеотид, удлиненный у конца 3' посредством либо G, либо T у основания номер 402 VH, обеспечивая наличие одного из альтернативных кодонов таким образом, что позиция 48 VH становилась либо L, либо I. Олигонуклеотиды (10 пМ каждого) фосфорилировали 5 единицами полинуклеотидкиназы T4 в общем объеме в 52 μл при 37°C в течение 1 часа. 1 пМ каждого мутагенного праймера и 1 пМ праймера последовательности M13 (от 3' до V-гена) отжигали до 0,5 μг матрицы в общем объеме в 20 μл нагреванием до 90°C в течение 30 секунд, быстро охлаждая до 70°C и медленно охлаждая до 37°C. Отожженные (ренатурированные) праймеры затем удлиняли и лигировали с добавлением ДНК-полимеразы T7 и ДНК-лигазы T4, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Урацилсодержащую матричную ДНК удаляли, обрабатывая ДНК 1 единицей урацил-ДНК-Глюколазы при 37°C в течение 1 часа, оставляя мутировавшую цепь интактной. Эту ДНК амплифицировали посредством PCR и затем анализировали агарозным гель-электрофорезом с целью проверки получения ДНК правильного размера. Полученную ДНК разрезали с помощью HindIII и BamHI и лигировали в HindIII и BamHI сайты M13mp19.

Аналогичным образом реконфигурированный VK-ген TM23 (TM23HuVK) конструировали мутагенезом матрицы фага M13, которая содержит ДНК-последовательность VK-гена с основными областями человеческого белка Бенса-Джоунза REI (Bence-Jones). Его конструировали мутагенезом из VKPCR1 M13, который использовался в конструировании химерной легкой цепи с удаленными рестрикционнотермическими сайтами PvuII и BclI, используемыми для клонирования. Используемыми праймерами были:

```
CDR1 -
    5'          TCTGCTTGGTACCAGTTTAAATAATTGCTAATGCCCTGACTTGCACTACAGGTGATGGTC
        3',
CDR2 -
    5'          TCTGCTTGGCACACCTGAGTGTAACCTTGATGTGTAGTAGATCAGCAGCTT
        3',
и CDR3-
    5'          CCCTTGGCCGAACGTCCGAGGAAGTTTACTATACTGCTGGCAGTAGTAG
        3'.
```

Были получены и клонированы в вектор M14mp19 PCR-продукты ожидаемого размера: 823 п/о для обоих VH, и 620 п/о для VK.

Проверка гуманизированных ДНК-последовательностей переменных областей.

Было подтверждено, что вставки представляют собой нужные hv-участки, что никакие паразитные изменения не имели места, и что сконструированы правильные гуманизированные VH и VK гены. Законченные переменные области секвенировали дидеокси-методом, используя ДНК-полимеразу T7, или секвеназу. Полученные последовательности сравнивали с расчетными последовательностями. Клоны, дающие ожидаемую последовательность для двух VH, отбирались. Эти клоны получили обозначения M13 TM23NMVH и V13 TM23NMVHL. Клон, дающий ожидаемую последовательность для реконфигурированного VK, № 11, отбирался и получил обозначение M13 TM23HuVK.

Клонирование реаранжированных V-областей в миеломные векторы экспрессии (Клонирование гуманизированных переменных областей TM23 в векторы экспрессии).

Клонированные гуманизированные переменные области переносились в векторы экспрессии, содержащие человеческие гены константных областей, для последующей экспрессии антитела в клетках млекопитающих. Два гуманизированных VH-гена выделяли из M13 TM23NMVH и M13 TM23NMVHL как фрагменты от HindIII до BamHI и лигировали в HindIII и BamHI сайты вектора экспрессии тяжелой цепи, pSVgpt.HuIgG₁.

Гуманизированный VK-ген выделяли из M13 TM23HuVK как фрагмент от HindIII до BamHI и лигировали в сайты HindIII и BamHI вектора экспрессии легкой цепи, pSVhyg.HuCK.

Рестрикционный анализ показал, что два альтернативных гуманизированных VH были правильно вставлены в вектор тяжелой цепи, образуя плазмиды pSVgptTM23NMVH.HuIgG₁ и pSVgptNMVHL.HuIgG₁.

Сходным образом, гуманизированный VK был правильно вставлен в вектор легкой цепи, образуя плазмиду pSVhygTM23HuVK.HuCK.

Котрансфекция конструкций H и L цепей в NSO-клетки.

Котрансфекция гуманизированных генов тяжелой и легкой цепей.

Плазмиды гуманизированной экспрессии переносили на клеточные линии млекопитающих - NSO и P3-8.653F8879.

Плазмиды гуманизированной экспрессии конструировали в клетки NSO и P3-8.653F8879, используя ту же процедуру, что и для химерных плазмид экспрессии.

Каждая из двух гуманизированных плазмид тяжелой цепи pSVgptTM23NMVH.HuIgG₁ и pSVgptNMVHL.HuIgG₁, была котрансфецирована с гуманизированной плазмидой легкой цепи, pSVhygTM23HuVK.HuCK, для получения клеточных линий, несущих экспрессию двух альтернативных гуманизированных антител, TM23HuVH/HuVK и TM23HuVHL/HuVK. Эти плазмиды экспрессии также котрансфецировали в комбинации с химерными плазмидами экспрессии с целью получения клеточных линий, несущих экспрессию гибридных антител TM23HuVH/MuVK, TM23HuVHL/MuVK, и TM23MuVH/HuVK. Эти гибридные антитела служат важными инструментами для локализации причины любого нарушения связывания как в тяжелой цепи, так и в легкой цепи гуманизированного антитела.

По истечении четырнадцати дней после трансфецирования NSO-колонии становились видимыми для всех различных плазмидных комбинаций. Только одну единичную колонию клеток P3-8.635F8879 получали от всех инокулированных планшетов, и остальные колонии поехали в отход.

Отбор IgG₁/каппа-положительных человеческих клонов.

Отбор клеток-продуцентов человеческих антител.

NSO-клеточные линии, продуцирующие гуманизированные и гибридные химерные/гуманизированные антитела, изолировали. Пробы супернатанта из лунок, содержащих клеточные колонии, обследовали по методике ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

TM23HuVH/HuVK: - были отобраны NSO-клетки в четырех лунках, где супернатант культуры давал самые высокие показания в ELISA: D5, D10, C6 и E11. Лунка D5 содержала 2 видимых колонии, остальные лунки - по одной. Однако клеточные линии, полученные от этих колоний, не обязательно предназначены для клонирования, клеточные линии из этих лунок культивировали и замораживали в жидком азоте как TM23HuVH/HuVK D5, D10, C6 и E11.

TM23HuVHL/HuVK: были отобраны NSO-клетки в четырех лунках, где супернатант культуры давал самые высокие показания в ELISA: B2, B7, D8 и E9. Лунка E9 содержала 2 видимых колонии, остальные - по одной. Однако клеточные линии, полученные от этих колоний, не обязательно предназначены для клонирования. Клеточные линии из этих лунок культивировали и замораживали в жидком азоте как TM23HuVHL/HuVK B2, B7, D8 и E9.

TM23HuVH/MuVK: были отобраны NSO-клетки в четырех лунках, где супернатант культуры давал самые высокие показания в ELISA: D9, E6, F10 и G10. Лунки F10 и G10 содержали по 2 видимых колонии, остальные - по одной. Однако клеточные линии, полученные от этих колоний, не обязательно предназначены для клонирования. Клеточные линии из этих лунок культивировали и замораживали в жидком азоте как TM23HuVH/MuVK D9, E6, F10 и G10.

TM23HuVHL/MuVK: были отобраны NSO-клетки в четырех лунках, где супернатант культуры давал самые высокие показания в ELISA: B8, C6, D2 и D8. Однако клеточные линии, полученные от этих колоний, не обязательно предназначены для клонирования. Клеточные линии из этих лунок культивировали и замораживали в жидком азоте как TM23HuVHL/MuVK B8, C6, D2 и D8.

TM23MuVH/HuVK: были отобраны NSO-клетки в четырех лунках, где супернатант культуры давал самые высокие показания в ELISA: B9, G4, G6 и G11. Все лунки содержали, по меньшей мере, по 4 видимых колонии. Клеточные линии, полученные от этих колоний, не обязательно предназначены для клонирования. Клеточные линии из этих лунок культивировали и замораживали в жидком азоте как TM23MuVH/HuVK B9, G4, G6 и G11.

Синтез кДНК первой цепочки для экспрессии CHO-клеток.

Подготовка цитоплазматической РНК.

Была подготовлена РНК для обратной транскрипции. Ампулу с NSO-клетками TM23HuVHL/HuVK восстанавливали из замораживания в жидком азоте быстрым оттаиванием при 37°C. Клетки постепенно разбавляли 10 мл модифицированной по способу Дульбекко среды Игла/средой F12 Хэма (DMEM/F12) с добавлением антибиотиков и 5% свободной от гаммаглобулина фетальной телячьей сыворотки (GG-free FBS). Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут, среду удаляли, и клетки ресуспендировали в 20 мл свежей среды в матрасе площадью 75 см². Затем объем культуры расширяли до 30 мл в матрасе площадью 175 см². Активно растущие клетки собирали центрифугированием и промывали три раза холодным физраствором с фосфатным буфером (ЗФР). Цитоплазматическую РНК получали из клеток методом Фаволоро (Favolero) и др., 1980 г. Было получено общее количество в 350 мкг цитоплазматической РНК.

Синтез кДНК.

Для VH- и VK-областей подготавливали кДНК первой цепочки. кДНК первой цепочки переменных областей синтезировали в реакциях, задействовавших 5 мкг РНК, 250 мМ деоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 15 единиц рибонуклеазного ингибитора ("Pharmacia RNA-guard"), и 25 pM олигонуклеотидного праймера. В качестве праймеров использовали олиго 1109 для VH

5'
3'

GGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACC

и олиго 1095 для VK

5' AGATTTTCAGCTGCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGG
3'

Реакционную смесь нагревали до 70°C в течение 10 минут и затем медленно охлаждали до 37°C. В смесь вводили 100 единиц обратной транскриптазы мышиного вируса лейкемии Молоуни (Moloney), и смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут.

Полученные кДНК амплифицировали посредством PCR, используя вышеприведенные праймеры в совокупности с праймерами:

олиго 1096 для VH

5 GCCGCTCGAGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAG
3'

и олиго 1094 для VK

5' GCCGCTCGAGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTT
GGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGACATCCAGATGACCCAGAG
3'

PCR-продукты проверяли агарозным гель-электрофорезом, и было определено их соответствие ожидаемому размеру (примерно 450 пар оснований), после чего ДНК-полоски очищали от геля.

Рестрикционноферментное переваривание.

PCR-продукты переваривали для клонирования в векторы CHO. VH-продукты PCR переваривали с XhoI и ApaI. VK-продукт PCR переваривали с XhoI и PvuII. Пробы переваренных ДНК проверяли электрофорезом на 0,8%-ном агарозном геле. На контроле наблюдались полоски ожидаемого размера 450 пар оснований.

Изолирование V-областей (V_H [TCS и S] и V_K [S]) из кДНК PCR-амплификацией V_H[TCS].

Пробы кДНК первой цепочки TM27 V_K и TM27 V_H, а также олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации этих молекул посредством PCR, были получены на этом этапе. PCR, использующую кДНК TM27 V_H с соответствующими праймерами, выполняли с задействованием Taq-полимеразы. Продукт прогоняли на агарозном геле и очищали, используя набор "Genedean II" (Bio 101). Выход по оценке составил ~1,5 нг/мл.

Трансфекция COS-клеток с pSR1Neo4H11 (легкая) и pBJ14H11 (тяжелая) для изолирования кДНК C-области.

Векторы экспрессии млекопитающих pSR1Neo и pBJ1 являются производными от pcDL-SRa296 (Takebe (Takebe) и др., Молекулярноклеточная биология, 8:466, 1988 г.), как описано у Лина (Lin) и др. (Наука, 249:677, 1990г.), где расположенный между SR α -промотором и SV40-сайтом полиденилирования XhoI-сайт замещается для удобства генного клонирования полилинкером, содержащим следующие сайты рестрикции: 5'XhoI/XbaI/Sil/NotI/EcoRI/ EcoRV/HindIII/ClaI3'. Ген устойчивости к неомицину в pSR1Neo был вставлен между геном устойчивости к ампициллину и SR α -промотором. Кодирующую последовательность кДНК и V-D-J-область тяжелой цепи TM23 вначале сливали с константной областью геномной тяжелой цепи, с последующей инсерцией в pBJ1-вектор, разрезанный XhoI и NotI, с формированием pBJ14H11 (тяжелая). Аналогичным образом, кодирующую последовательность кДНК легкой цепи и V-J-область вначале сливали с геномным k-фрагментом, с последующей инсерцией в pSR1Neo, разрезанный XhoI/NotI, с формированием pSR1Neo4H11 (легкая). Две плазмиды, pBJ14H11 (тяжелая) и pSR1Neo4H11 (легкая), затем котрансфецировали в клетки COS-7 (почечная клеточная линия африканской зеленой мартышки, трансформированная SV40 (OB40), ATCC CRL 1651) для переходной экспрессии.

Выделение человеческой константной области IgG₁.

кДНК человеческой IgG₁-константной области подготавливали из поли(A)⁺-РНК, изолированной посредством PCR из трансфецированных COS-клеток с использованием праймеров IgG₁-константной области:

прямого праймера

5' GCGTGACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC
3'

и обратного праймера

5' GCGTGACAAGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTT
3'

PCR-продуцированный фрагмент ДНК константной области с EcoRI у конца 3' (фланкирующий кодирующую область) и ApaI у конца 5' (в кодирующей области) клонировали в плазмиду pBS KS⁺ для субклонирования и секвенирования. Всю константную область целиком секвенировали, используя праймеры T3 и

T7, дополненные внутренними праймерами константной области. Клон с правильной последовательностью затем субклонировали в плазмиду pTCSLNeo, формируя pTCSLCg1Neo.

Конструирование плазмиды pTCSLCg1Neo.

Клон IgG₁Cg1 с правильной последовательностью в pBS KS⁺ вырезали, используя рестрикционные ферменты EcoRI и ApaI, и лигировали в pTCSNeo, переваренный с этими же ферментами. Полученную плазмиду, pTCSLCg1Neo, использовали для дальнейшего модифицирования с целью формирования pTCSLCg1NeoAra^r.

Исключение сайта ApaI из pTCSLC_к1Neo с целью формирования pTCSLC_к1NeoAra^r.

СНО-вектор экспрессии pTCSLC_к1Neo содержит два сайта для рестрикционного фермента ApaI. Один сайт, расположенный в пределах полилинкерной области, используемой для инсерции клонированных фрагментов; и второй сайт, расположенный непосредственно 3' относительно neo^r-гена. Для упрощения последующих операций клонирования сайт ApaI около neo^r удаляли. pTCSLC_к1Neo частично переваривали с ApaI; небольшую аликвоту прогоняли на агарозном геле с целью проверки присутствия линейных молекул (т.е. плазмид, разрезанных только у одного из ApaI-сайтов). Переваренный материал затем обрабатывали ДНК-полимеразой T4, которая избирательно удаляет одноцепочечные удлиняющие сегменты, оставленные ApaI, не переваривая двухцепочечную ДНК. Плазмиды затем рециркуляризировали лигированием и трансформировали в компетентные *E. coli*-клетки HB101. Тридцать трансформантов отбирали и использовали для инокуляции суспендированных культур. Из каждой культуры подготавливали ДНК, переваривали ее с ApaI и прогоняли на агарозном геле. К сожалению, плазмидная ДНК в этих переварах подвергалась деградации. ApaI-перевары повторяли на 21 из 30 проб. Два изолята (№№ 4 и 12) оказались ApaI-минеаризованными, тогда как все остальные были разрезаны у обоих сайтов. Эти два перспективных клон-а затем переваривали с ApaI и HindIII с целью определения, какой из ApaI-сайтов присутствует в продукте. В этом анализе ApaI-сайт в позиции 3' относительно neo^r в pTCSLC_к1NeoAra^r (изолят № 12) был удален, как требовалось. Были выполнены дополнительные рестрикционные перевары, которые подтвердили структуру этого изолята.

Клонирование PCR-изолированных V-областей человеческой каппа-цепи и тяжелой цепи в СНО-векторы, pTCSLC_кDHFR и pTCSLCg1NeoAra^r, соответственно.

Клонирование V_к-фрагмента TM27 в pTCSLC_кDHFR.

кДНК для V-области каппа-цепи для TM27 очищали гелем и переваривали с соответствующими рестрикционными ферментами. Небольшую аликвоту ДНК-пробы анализировали на 1%-ном агарозном геле для оценки количества и подтверждения качества. Лишняя (контаминантная) полоска наблюдалась примерно у 800 п/о; концентрация по оценке составляла 1,25 нг/мл. V-область лигировали с вектором pTCSLC_кDHFR, переваренным с рестрикционными ферментами XhoI и PvuII и обработанными фосфатазой. Лигационную смесь использовали для трансформирования компетентных DH5α-клеток *E. coli*. Выход трансформантных колоний был очень низким. Единичные колонии собирали и использовали для инокуляции двенадцати суспендированных культур. Из каждой подготавливали ДНК, которую переваривали с XhoI и PvuII и анализировали на 1%-ном агарозном геле. Две пробы, № 3 и № 4, оказались положительными. Каждую из этих положительных проб секвенировали.

Клонирование V_{II}-фрагмента TM27 в pTCSLC_к1NeoAra^r.

PCR-продукт, соответствующий V_{II}-области TM27, очищали гелем и переваривали с соответствующими рестрикционными ферментами (XhoI и ApaI). Однако поскольку было замечено, что ApaI-переваривание может быть неполным, это переваривание повторяли. Небольшую аликвоту анализировали на агарозном геле с целью оценки количества и проверки качества. Концентрация полоски, соответствующей V_{II}-области, составила по оценке 0,4 нг/мл. Как и в случае с V_к-фрагментом, наблюдалась лишняя полоска примерно у 800 п/о, что давало основание считать, что чистота материала не соответствовала ожидаемой. V_{II}-область лигировали с вектором pTCSLC_к1NeoAra^r, переваренным с рестрикционными ферментами XhoI и ApaI и обработанным фосфатазой. Лигационную смесь использовали для трансформирования компетентных DH5α-клеток *E. coli*. Выход трансформантов был очень небольшим. Шесть собранных колоний использовали для инокуляций суспендированных культур. Из каждой подготавливали мини-препарат ДНК, который переваривали с XhoI и EcoRI и анализировали на агарозном геле. Из первого лигирования был получен один перспективный клон, pTCSLHuV_{II}4HC_к1NeoAra^r (изолят № 6). С целью получения дополнительных перспективных клонов (на случай, если единственный изолят № 6 не выявит правильную последовательность в последующих анализах) проводили дополнительные операции лигирования, используя 1) PCR-продукт V_{II}, повторно очищенный на агарозе с низкой точкой плавления с целью удаления контаминантной полоски с высоким молекулярным весом, и 2) PCR-продукт V_{II}, синтезированный с использованием кДНК и праймеров. По результатам этих реакций лигирования восемь дополнительных трансформантов были проанализированы, и пять перспективных клонов были отобраны: №№ 9, 10, 11, 12 и 14.

Секвенирование клонированных в обе цепочки V-областей для подтверждения ожидаемой ДНК-последовательности.

Праймеры, предназначенные для облегчения секвенирования V-областей, вставленных в векторы pTCSLC_к1NeoAra^r и pTCSLC_кDHFR, были получены от "Operon Research". Прямой праймер располагался в пределах pTCS-векторных последовательностей и использовался для секвенирования V-вставок и в pTCSLC_к1NeoAra^r, и в pTCSLC_кDHFR. Обратные праймеры располагались в пределах Sk или Sk1-последовательности и использовались для секвенирования вставок V_к и V_{II}, соответственно.

Двухцепочечное секвенирование V-области человеческой каппа-цепи.

Две пробы от TM23 (№ 3 и № 4) секвенировали для обеих цепочек. Обратную цепочку секвенировали полностью, через рестрикционноферментные сайты (3'-5'; PvuII-XhoI), используя праймер HUCK5PR. Пос-

последовательность прямой цепочки определяли используя два различных праймера, PTCSFOR и PNCSFWD. Последовательность по всей длине через рестрикционно-ферментные сайты ((5'-3', XhoI-PvuII) получали, объединяя последовательности, выданные от каждого из праймеров. В прямых цепочках наблюдалось присутствие небольшой зоны сжатия, разрушение которой не удавалось получить ни праймерами, ни использованием метода секвенирования, ослабляющего такие сжатия. Однако обратная цепочка показала на этом участке правильную последовательность. Обе пробы № 3 и № 4 по результатам анализа имели правильные последовательности, и проба № 4 была отобрана для использования в трансфекции клеток млекопитающих.

Двухцепочечное секвенирование V-области гамма-цепи TM27.

V_H-фрагменты pTCSLHuV_H4HC_κ1NeoAra⁺ (изоляты № 6 и № 9) секвенировали полностью по обоим цепочкам. Гуманизированный V_H-фрагмент изолята № 6 соответствовал с ожидаемой последовательностью по всей кодирующей области. Имела место замена единственной пары оснований (С на Т) в позиции - 2 (по отношению к АТГ иницирования), которая, по расчетам, не должна была оказаться на экстремии. V_H-фрагмент изолята № 9 содержал 2 замены в кодирующей области. Четыре дополнительных перспективных клона не секвенировали.

Котрансфекция клеток COS и CHO с TM27 и контрольными плазмидами.

Клетками-реципиентами были CHO dhfr⁻ DUX B11 и COS-1. Клеточная линия CHO DUX B11 была получена от "Biogen Inc". Для CHO-трансфекции пять микрограммов TM27-плазмид pTCSLHuV_H4HC_κDHFR (изолят № 4), pTCSLHuV_H4HC_κNeoAra⁺ (изолят № 6), и векторов pTCSLDHFR⁺Ara и pTCSLNeoAra⁺ линеаризовали перевариванием с рестрикционным ферментом AatII. TM27-содержащие плазмиды (помеченные "TM27") совместно преципитировали в этаноле и ресуспендировали в H₂O. Аналогичным образом, векторные плазмиды (помеченные "Контроль") совместно преципитировали и ресуспендировали в H₂O. Каждую из со-осажденных плазмид трансфектировали в 10⁷ CHO-клеток методом электропорации, используя прибор "BioRad Gene Pulser", при 250В и 960мФ. Трансфектированные клетки затем выращивали в минимальной поддерживающей среде "α" (αMEM), дополненной тимидином, аденозином и дезоксиаденозином (незлективные среды) в течение двух дней, предшествующих отбору.

Для COS-трансфекции пять микрограммов неразрезанных TM27L плазмид и векторных плазмид совместно преципитировали в этаноле и ресуспендировали в H₂O. Эти плазмиды трансфектировали в 4,1x10⁶ COS-клеток методом электропорации. Трансфектированные клетки выращивали в модифицированной по способу Дюльбекко среде Игла (DMEM) в течение трех дней, а затем супернатант собирали для анализов.

Анализ супернатантов COS-трансфектантов ELISA-тестированием с человеческим IgG₁ и окрашиванием.

Продукцию человеческого IgG COS-клетками измеряли ELISA-тестированием содержания человеческого IgG₁ в супернатантах клеточной культуры. Титрационные микропланшеты покрывали разведенным в 3ФР мышинным Fc антителом, враждебным человеческому IgG₁, и блокировали блокирующим буфером (1% BSA (альбумина бычьей сыворотки) в 3ФР). Супернатанты подавали 100 μл пробами; соответствующие разбавления в блокирующем буфере анализировали по мере необходимости. Захваченный IgG обнаруживали с помощью конъюгированного пероксидазой из хрена враждебного человеку козьего IgG-антитела и OPD (о-фенилендиамина). Супернатанты от TM27L-трансфектированных COS-клеток показывали уровни концентрации человеческого IgG в 95 нг/мл. Человеческий IgG от контроль-трансфектированных COS-клеток не поддавался обнаружению. Проточную цитометрию выполняли на супернатантах от TM27L-трансфектированных COS-клеток с примерно шестикратной концентрацией. Интенсивность окрашивания на HPB-клетках, как свидетельствует флуоресценция среднего канала, была примерно в девять раз ниже, чем полученная у очищенных TM27L (очищенных от NSO-клеток) при приблизительно 25 мг/мл. На клетках Джурката (Jurkat) окрашивание было на уровне фона.

Отбор CHO-трансфектантов.

CHO-трансфектанты помещали на селекцию в средах αMEM без нуклеотидных дополнений (для отбора DHFR⁺ на pTCSLHuV_H4HC_κDHFR), и содержащих "Geneticine" (G418: для отбора neo^r на pTCSLHuV_H4HC_κ1NeoAra⁺). Клетки высевали с плотностью 2,0x10⁵ клеток/мл в 24-луночные планшеты.

Анализ супернатантов CHO-трансфектантов ELISA-тестированием на человеческий IgG₁.

После 12 дней в избирательных средах супернатанты из сообщающихся лунок собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁/к. Концентрации в TM27L-супернатантах лежали в пределах 182-236 нг/мл. Большинство концентраций составляло ≥200 нг/мл. Человеческий IgG₁/к в супернатантах контроля не поддавался обнаружению. Клетки из двенадцати высокопродуктивных TM27-лунок разносили в матрасы T23. Единичные ампулы замораживали в качестве опорных культур и хранили в жидком азоте. Клетки из двух лунок контроля также переносили в матрасы T25 и замораживали.

Первый посев CHO-трансфектантов методом конечного разведения.

Четыре лунки с наиболее высокой продуктивностью выбирались для посева методом конечного разведения в 96-луночные планшеты: лунки №№ 1 B1 (232, 6 нг/мл), 1D6 (233,3 нг/мл), 2B2 (235,5 нг/мл), и 2C1 (236,0 нг/мл). Для каждой лунки подготавливались три планшета с избирательными средами: один с 1 клеткой на лунку, и два с 0,5 клетки на лунку.

Супернатанты первого цикла клонирования обследовали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁/к. Клетки от 90 лунок с высокой продуктивностью разносили в 24-луночные планшеты и давали им вырасти до взаимослияния. Супернатанты от 12 из этих культур анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁/к и проточной цитометрией. Концентрации IgG₁/к в ELISA-тестах лежат в пределах от 211 до 1048 нг/мл. Все пробы окрашивали HPB-клетки (флуоресценция среднего канала в пределах от 46,5 до

169,9) и не окрашивали клетки Джурката. Шесть наиболее продуктивных клонов разносили и замораживали (как опорные культуры) в жидком азоте. Из этого числа два наиболее продуктивных клон (1B1-C7 и 2B2-H9) отбирали для продолжения выполнения последующих циклов клонирования.

Две первичные культуры контрольных конструкций также пропускали через один цикл посева методом конечного разведения в 96-луночные планшеты. Один клон от каждой из культур отбирали и размножали. Супернатанты анализировали и в ходе ELISA-тестирования не показывали никакого поддающегося обнаружению сигнала в части человеческого IgG₁/κ (стр. 640-83). Клетки замораживали и хранили в жидком азоте.

Размножение неклонированных культур в масштабах роллер-флаконов для очистки антител.

Две первичные культуры (1B1 и 2B2) размножали с целью получения достаточного количества материала для очистки антитела TM27. Клетки переносили в 2 л роллер-флакон и адаптировали к пониженной концентрации сыворотки (через T25 в 10%-ной сыворотке - κ > T75 в 10%-ной сыворотке - κ > 3xT75 в 5%-ной сыворотке - κ > 3x2 л-флаконам в 1%-ной сыворотке) (стр. 640-24). Эти двухлитровые флаконы засеивали в первый день и подпитывали (заменяя половину объема свежей средой с 1%-ной сывороткой) на 2-й, 5-й и 8-й дни. Первый сбор выполняли на десятый день, второй - на двенадцатый день, и третий - на пятнадцатый день. Собранные супернатанты центрифугировали и хранили при -20°C до очистки.

Очистка антитела на колонке с А-белком.

Супернатанты от колоний культуры 2B2 объединяли (общий объем 2,7 литра) и фильтровали через 0,22-микроновую мембрану из нейлона. ELISA-тестирование на человеческий IgG₁ свидетельствовало о том, что общее количество исходного материала составляло 1090 мг. Антитело очищали на колонке с Prosep-A (А-белок), элюируя 0,1М цитратом при pH 5,0, 4,0 и 3,0. Элюаты диализировали в 3ФР. Количественные показатели очищенного антитела в элюированных фракциях измеряли ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Фракция с pH 3,0 содержала основную (большую) часть очищенного антитела, тогда как во фракции с pH 4,0 было найдено лишь небольшое количество материала. ELISA-тестирование на человеческий IgG₁ повторяли для получения более точных замеров концентрации. Общий выход TM27 (фракции pH 3,0 и pH 4,0) составил 960 мг.

А-белковая очистка антител из супернатантов культур NSO-трансфектантов.

Антитела из культуральных супернатантов NSO-трансфектантов очищали на колонке с А-белком в целом как описано выше.

Дискриминирование между антителом TM27 и миеломными клеточными линиями NSO.

Моноклональное антитело TM27, очищенное из культурных супернатантов NSO-трансфектантов с использованием хроматографии на колонке с А-белком, использовали для окрашивания клеток HPB-ALL (Vβ 5,2) и клеток Джурката (Vβ 8,1) в качестве отрицательного контроля в сравнении с мышиным мАт, TM23, и химерным TM27. TM27 давало положительное окрашивание на HPB-ALL, но не окрашивало клетки Джурката.

Для определения специфичности TM27 обычные Т-клетки PBL окрашивали с помощью TM27 в сравнении с мАт TM27. И TM27, и TM23 окрашивали примерно 3,0% всех человеческих PBL Т-клеток. Был выполнен конкурентный анализ, в котором фиксированную концентрацию ФИТЦ-меченного мАт TM23 добавляли в различные концентрации помеченного 4Н11 или TM27. Смеси антител затем использовались для окрашивания HPB-ALL-клеток. И немеченный TM23, и TM27 блокировали окрашивание посредством ФИТЦ-меченного TM23. Для определения того, может ли TM27 со-модулироваться с антигеном CD3, клетки HPB-ALL инкубировали с различными концентрациями мАт TM27 и TM23 до следующего дня и затем окрашивали с помощью анти-CD3 мАт. Результаты анализа свидетельствовали о том, что TM27, равно как и TM23, могут вызывать эндоцитоз комплекса TCR/CD3.

Анализ Скэтчарда выполняли для измерения связывающего свойства TM27 по отношению к клеткам HPB-ALL. И в анализе Скэтчарда, и в конкурентном (с мАт TM23) анализе результаты свидетельствовали о том, что TM27 сохранял примерно один и тот же уровень аффинности ($K_d=2,0 \times 10^{-6} \text{M}^{-1}$) и хорошо конкурировал с мАт 4Н11.

Было также выполнено сравнение TM27/NSO и TM27/CHO в конкурентном анализе с 4Н11, результаты которого приведены на фиг. 3. Результаты приведенного анализа Скэтчарда показаны на фиг. 4.

Второй посев CHO-трансфектантов методом конечного разведения.

Посев методом конечного разведения выполняли, как изложено выше. Содержимое лунок обследовали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Клетки из шести лунок от каждого планшета (1B1-C7 и 2B2-H9) рассевали в 24-луночные планшеты и затем обследовали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Два клон с самой высокой продуктивностью по результатам каждого анализа размножали и замораживали в жидком азоте. Клоны с самой высокой производительностью от каждой партии отбирали для заключительного цикла субклонирования.

Третий посев CHO-трансфектантов методом конечного разведения.

Посев методом конечного разведения выполняли, как изложено выше. Содержимое лунок обследовали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Клетки из шести лунок от каждого планшета (1B1-C7 и 2B2-H9) рассевали в 24-луночные планшеты и затем обследовали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Три клон с самой высокой продуктивностью по результатам каждого анализа рассевали в матрасы T75, и затем замораживали в жидком азоте. В это время из среды убрали Geneticin, устраняя, таким образом, избирательность по neo^r. Избирательность по DHFR сохранялась. Супернатанты обследовали ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Клон 1B1-C7 продуцировал 4,69 мг/10⁶ клеток в день. Клон 2B2-H9 продуцировал 2,65 мг/10⁶ клеток в день. Поэтому изолят C7 был отобран в качестве конечного клон, а изолят H9 был отобран в качестве альтернативного клон.

Подготовка замороженных клеточных линий.

Конечный клон, отобранный выше, размножали в 5 матрасах T225 с целью получения достаточного количества клеток, чтобы сформировать банк замороженных клеточных линий. Клетки с этих матрасов собирали и объединяли. Объединенная суспензия содержала 98,3% жизнеспособных клеток. Общий счет жизнеспособных клеток составил $1,58 \times 10^6$, достаточное количество для подготовки желаемого числа в 72 ампулы с 2×10^6 клеток на ампулу. Клетки замораживали и маркировали как "TM27L-662-35". Дополнительно, альтернативный клон H9 размножали в одном матрасе T225 с целью формирования небольшого банка замороженных клеток. Собранные с этого матраса клетки были жизнеспособными на 97,3%. Суспензия содержала достаточное количество клеток для подготовки 9,7 ампул с 2×10^6 клеток на ампулу (стр. 662-89). Клетки замораживали в жидком азоте и маркировали как "TM27L-662-89".

Тестирование клеток, восстановленных из замороженного материала.

Проверка жизнеспособности и микоплазматического загрязнения.

Одну ампулу замороженного клеточного материала TM27L-662-35 оттаивали и восстанавливали в α MEM. Жизнеспособность клеток определили в 88% окрашиванием с помощью трипанового синего. Сливающиеся культуры, выращенные из этой ампулы, тестировали на микоплазматическое заражение с использованием набора от Bionique Testing Laboratories. Анализ не выявил никакого загрязнения. Дополнительно, оттаивали одну ампулу замороженного клеточного материала TM27L-662-89. Окрашиванием с помощью трипанового синего жизнеспособность клеток была определена в 93,8%. Сливающиеся культуры, выращенные из этой ампулы, тестировали на микоплазматическое заражение, как изложено выше. Анализ не выявил никакого загрязнения. Обе культуры были рассеяны в матрасы T75, и супернатанты клеточных культур обследовались ELISA-тестированием на человеческий IgG₁. Клон TM27L-662-35 продуцировал 3,24 $\mu\text{g}/10^6$ клеток в день, а клон TM27L-662-89 продуцировал 2,52 $\mu\text{g}/10^6$ клеток в день. Во втором анализе, клон TM27L-662-35 продуцировал 3,03 $\mu\text{g}/10^6$ клеток в день, а клон TM27L-662-89 продуцировал 2,74 $\mu\text{g}/10^6$ клеток в день.

Экспрессия TM27L-662-35 в масштабах роллер-флаконов для очистки антитела.

Культуру TM27L-662-35 размножали с целью получения достаточного количества материала для очистки антитела TM27L. Клетки переносили в двухлитровые роллер-флаконы и адаптировали к пониженным концентрациям сыворотки (через T25 в 10%-ной сыворотке к T75 в 10%-ной сыворотке к 3xT75 в 5%-ной сыворотке к 3x2 л-флаконам в 1%-ной сыворотке). Эти двухлитровые флаконы засевали в первый день и подпитывали (заменяя половину объема свежей средой с 1%-ной сывороткой) на 2-й, 5-й, 7-й и 9-й дни. Первый сбор выполняли на двенадцатый день, второй - на четырнадцатый день и третий - на шестнадцатый день. Собранные супернатанты центрифугировали, фильтровали и хранили при -70°C до очистки.

Очистка антитела на колонке с А-белком.

Супернатанты от культур TM27L-662-35 объединяли в общий объем в 5,1 литра. Антитело связывали в колонке с Proser-A (А-белком) и элюировали 0,1 М цитрата при pH 5,0 и 3,0. Элюат с pH 3,0 диализировали в 3ФР. Величины содержания антитела в исходном материале и в элюированных фракциях измеряли ELISA-тестированием на человеческий IgG₁/каппа. Фракция с pH 3,0 содержала примерно 3,9 мг антитела в 25 мл. Материал концентрировали на концентраторе Centriprep-30 (фирма Amicon) и повторяли ELISA-тестирование на человеческий IgG₁/каппа. Общий выход TM27L составил примерно 3,2 мг при концентрации в 1,6 мг/мл.

Предварительные характеристики очищенного антитела.

Проточную цитометрию выполняли примерно на 2,5 мг материала от каждой из фракций (pH 3,0 и pH 4,0) и TM27, очищенного из NSO-клеток. Интенсивность окрашивания на HPB-клетках, как видно из показателей флуоресценции среднего канала, была следующей: 283,46 для фракции с pH 3,0; 321,98 для фракции с pH 4,0; 506,79 для TM27 от NSO. На клетках Джурката окрашивание было на уровне фона для всех проб.

Пример 2. Последовательности CDR-трансплантированных антител TM27 в сравнении с кластерами человеческой основной структуры

```

TM27 Vk
1      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISN YLNWYQQTPGKAPKLLIYY
      50
REI      =====Q===D=IK=====E
TM23     =====TT=====L=====S=====K-DGTV=====
WAL      =====R===S=====K=====A
51      TSSLHSGVPSRFGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQYSKLPRTFGQ
      100
REI      A=N=QA=====QS==Y====
TM23     =====SL===N=E=====G
WAL      A===Q===T=====F=L=====SYSTLI====
101     GTKLQIT

      107
REI      =====
TM23     =====E=K
WAL      =====R=E=K
TM27 VH

```



```

      *                               *                               *
      *                               *                               *
DTLKG RFTIS RDNPK NTLFL QMTSL RSED T AMYYC      ARRGE GAMDY
WGQGT
      160                               170
      *                               *
SVTVS  SAKTT PPSVY  PLAPG

Легкая цепь

      50      30      10      40      20

      *                               *                               *
      *                               *                               *
ISQGT  KFXYT  MDFQV  QIFSF  LLISI  SVVMS  RGENV      LTQSP  AIMS A  SLGEK
      60                               70
      80                               90
      100
      *                               *                               *
      *                               *                               *
VTMSC  RASSS  VNYYI  WYQQK  SDASP  KLWIY  YTSNL      APGVP  TRFSG  SGSGN
      110                               120      130
      140      150
      *                               *                               *
      *                               *                               *
SYSLT  ISSME  GEDAA  TYQCQ  QFTSS  PFTFG  SGTKL  EIKRA  DAAPT  VSIFP
      153
      *
PSS

```

Данные секвенирования белков:

H=DVQLVE?GGGLVQPG

L=ENVLTQ

Пример 6.

Краткое изложение работы по TM29.

* Подготовка гибридом, в существенной степени как изложено в примере 1, и выделение кДНК (описана в примере 5).

* Клонирование изолированных кДНК (H и K) (из гибридомы 16G8) в векторы M 13.

* Введение человеческой остовой структуры (V_HK₀₁/V_KREI) посредством мутагенеза.

* Клонирование CDR-трансплантированных V-областей в миеломные векторы экспрессии.

* Очистка гуманизированных антител (примерно 1 мг каждого) из NSO-трансфектантов для предварительной оценки. Были получены четыре различных TM29:

TM29

TM29.1 с изменениями SS на AA (23-24).

TM29.2 с изменением S на P (75).

TM29.3 с изменениями GV/F на AM/Y (92-93/95).

Подробное описание хода эксперимента - TM29.

Выделение константной области человеческой каппа-цепи с помощью PCR-метода.

Используя неперевааренную плазмиду pSV184ΔH-Neo/DNS-V_KC_K (pSVHuk, которая содержит константную область человеческой каппа-цепи), выполняли PCR с двумя праймерами (одним прямым и одним обратным) для изолирования указанной константной области. Олигомеры (праймеры) были получены от фирмы "Oregon". Реактивы для реакции PCR были взяты из набора ДНК-амплификационных реактивов "GeneAmp" с "AmpliTaq" ("Perkin-Elmer Cetus"). PCR-реакции осуществлялись при трех различных концентрациях Mg²⁺. Аликвоты PCR-продуктов анализировали на 1%-ном агарозном геле. Был выбран продукт от первой пробы Mg²⁺ (концентрация 1,5 мМ). Праймеры, фланкирующие С-область, были рассчитаны на содержание рестрикционноферментных сайтов для целей клонирования. Таким образом, амплифицированную ДНК переваривали с EcoRI (у конца 3'). Сайт у конца 5' (PvuII) не переваривали. Переваренный ДНК-фрагмент затем прогоняли на 1%-ном агарозном геле, и зону в 300 п/о эсцизировали. ДНК экстрагировали из геля, и небольшую аликвоту анализировали на 1%-ном агарозном геле для определения качества и оценки количества. Полоска в 300 п/о оказалась чистой, и общее количество ДНК по оценке составило примерно 140 нг.

Клонирование константной области человеческой каппа-цепи в вектор pBS KS⁺ и секвенирование.

EcoRI-переваренный ДНК-фрагмент константной области человеческой каппа-цепи вставляли в вектор pBS KS⁺ переваренный с SmaI и EcoRI, используя ДНК-лигазу T4. Эту лигационную смесь использовали для трансформирования OH5α-компетентных клеток E. coli. Были собраны единичные колонии, которые использовались для инокуляции 24 суспендированных культур. От каждой из культур подготавливали ДНК. Каждая проба ДНК переваривалась с PvuII (конец 5' C_K) и EcoRI (конец 3' C_K) и анализировалась на 2%-ном агарозном геле. Из-за сложности в отделении полос нижнего ранга (300 п/о) ДНК-пробы переваривались

только с PvuII. После анализа на 2%-ном агарозном геле 19 из 24 проб оказались верными для Ск-инсерций. Пробы №№1-5 (из 19 правильных проб) были выбраны для секвенирования, с использованием праймеров T7 и T3 (последовательности в векторе, фланкирующие вставку). Другие реактивы для секвенирования были взяты из набора "Секвенза, версия 2.0" (USB). Проба № 5 показала наличие правильной последовательности для константной области человеческой каппа-цепи.

Клонирование константной области человеческой каппа-цепи в вектор экспрессии млекопитающих - pTCSLDHFR* для преобразования его в pTCLC_кDHFR*.

Константную область человеческой каппа-цепи изолировали от вектора pBS KS⁺ (проба №5), используя рестрикционные ферменты PvuII и EcoRI. Однако из-за уже знакомой проблемы в отделении полос второй перевар был выполнен с конструкцией pBS/человеческая С_к. Второе переваривание задействовало EcoRI и XbaI (расположенный 5' к сайту PvuII) и дало фрагмент примерно в 300 п/о. Этот фрагмент затем очищали гелем и подвергали PvuII-перевариванию с целью удаления остающихся небольших фрагментов вектора у конца 5' С_к. Этот конечный фрагмент очищали гелем и анализировали на 1%-ном агарозном геле с целью определения качества и оценки количества. Было выяснено, что С_к-ДНК представляет собой чистую полоску с ~280 п/о и с общим количеством по оценке примерно 135 нг.

Из-за наличия трех EcoRI-сайтов в векторе экспрессии, pTCSLDHFR*, было определено, что клонирование лучше всего осуществлять в сайт PvuII. Поскольку С_к-ДНК была подготовлена перевариванием с PvuII-EcoRI, для EcoRI-конца выполняли репарацию (формируя "тупой" конец), используя фрагмент Кленова. Восстановленную С_к-ДНК с "тупым" концом лигировали с вектором pTCSLDHFR*, переваренным с PvuII и обработанным фосфатазой (с использованием фосфатазы, полученной из тонкого кишечника телят). Эту лигационную смесь использовали для трансформирования DH5α-компетентных клеток *E. coli*. Единичные колонии собирали и использовали для инокуляции 24 суспендированных культур. Из каждой была подготовлена ДНК. Все ДНК-пробы переваривали с PvuII и HindIII и анализировали на 1%-ном агарозном геле. Было определено, что пять проб из двадцати четырех содержали С_к-вставку в правильной ориентации. Проба № 7 была отобрана для дальнейшей работы.

Замещение мутантного DHFR*-гена DHFR-геном "дикого" типа.

Для экспрессии вектора pTCLC_кDHFR* в (dhfr^r) DUX B11-клетках CHO, DHFR* -ген замещали DHFR-геном. ДНК от pTCLC_кDHFR*- пробы № 7, а также pSV2-DHFR (плазмиду, полученную от д-ра Пола Берга, см. выше), переваривали с рестрикционными ферментами HindIII и BglII, изолируя соответствующие генные фрагменты. По результатам анализа было определено, что дополнительный BglII-сайт в векторе pTCLC_кDHFR* также удалял часть сайта polyA, что могло бы помешать векторной функции. Поэтому переваривание повторяли, используя HindIII и BamHI. Часть (DHFR*) pTCSLC_к вектора обрабатывали фосфатазой. Затем оба изолированных фрагмента (pTCSLC_к и DHFR) очищали гелем и анализировали на 1%-ном агарозном геле для определения качества и оценки количества. Обе полоски по результатам анализа были чистыми и, по оценке, имели сходную концентрацию - примерно 40-50 нг/мл. DHFR-ген лигировали с вектором pTCSLC_к, используя ДНК-лигазу T4. Лигационную смесь использовали для трансформирования DH5α-компетентных клеток *E. coli*. Единичные колонии собирали и использовали для инокуляции 24 суспендированных культур. Из каждой приготавливали ДНК. ДНК анализировали перевариванием с рестрикционными ферментами HindIII и BamHI. 23 из 24 культур давали правильные полоски, указывающие на инсерцию DHFR-гена в вектор pTCSLC_к. Пробу № 22 отбирали для дальнейшего использования.

Клонирование PCR-изолированной V-области человеческой каппа-цепи в CHO-вектор pTCSLC_кDHFR.

кДНК для V-области каппа-цепи для 16G8 очищали гелем и переваривали с соответствующими рестрикционными ферментами. Небольшую аликвоту ДНК-пробы анализировали на 1%-ном агарозном геле для оценки количества и проверки качества. Лишняя (контаминантная) полоска наблюдалась примерно у 800 п/о; концентрация по оценке составила 1,25 нг/мл. V-область лигировали с вектором pTCSLC_кDHFR, переваренным с рестрикционными ферментами XhoI и PvuII и обработанным фосфатазой. Лигационную смесь использовали для трансформирования компетентных DH5α-клеток *E. coli*. Выход трансформантных колоний был очень низким. Единичные колонии собирали и использовали для инокуляции двенадцати суспендированных культур. Из каждой приготавливали ДНК, которую переваривали с XhoI и PvuII и анализировали на 1%-ном агарозном геле. Четыре пробы были положительными: № 1, № 4, № 7 и № 10. Каждую из положительных проб секвенировали. PCR-изолированную V-область гамма-цепи TM29 клонировали в CHO-вектор pTCSLCg1NeoApa

Двухцепочечное секвенирование V-области человеческой каппа-цепи.

Четыре пробы от 16G8 (№№1, 4, 7 и 10) секвенировали для обеих цепочек. Обратную цепочку секвенировали полностью, через рестрикционноферментные сайты (3'-5'; PvuII-XhoI), используя праймер HUCK5PR. Обе пробы № 1 и № 4 давали правильные последовательности, проба № 7 не секвенировалась, а проба № 10 имела неправильную последовательность. Для проб № 1 и № 4 последовательность прямой цепочки определяли, используя два различных праймера, PTCSFOR и PTCSFWD. Последовательность по всей длине через рестрикционноферментные сайты (5'-3'; XhoI-PvuII) получали, объединяя последовательности, выданные от каждого из праймеров. В прямых цепочках наблюдалось присутствие небольшой зоны сжатия, разрешение которой не удавалось получить ни с помощью любого из праймеров, ни использованием метода секвенирования, ослабляющего такие сжатия. Однако обратные цепочки показали на этом участке правильную последовательность. Обе пробы № 1 и № 4 по результатам анализа имели правильные последовательности, и проба № 4 была отобрана для использования в трансфекции клеток млекопитающих.

Котрансфекция плазмид легкой и тяжелой цепей TM29 в клетки COS и CHO.

В котрансфекции плазмид легкой и тяжелой цепей TM29 использовались клетки как COS-1, так и CHO (dhfr⁻) DUX B11. Клеточная линия CHO DUX B11 была получена от фирмы "Biogen, Inc." и исходно была создана д-ром Лоренсом Чейзином (Lawrence Chaisin) (Колумбийский университет).

Для трансфектирования клеток COS-1 5 мг каждой из непереверенных плазмид TM29 (pTCSLHuV_h16GC_hDHFR и pTCSLHuV_h16GC_h1Neo-Apa⁺; TM29-4 и TM29-26, соответственно) преципитировали в этаноле и ресуспендировали в H₂O с концентрацией 1 мг/мл. Плазмиды затем котрансфецировали в 3,8x10⁶ клеток посредством электропорации, используя прибор "BioRad Gene Pulser" при 250 В, 960 мФ. Трансфецированные клетки ресуспендировали в DMEM и помещали в культуру на три дня. Контрольные векторные плазмиды (pTCSLDHFRapa⁺ и pTCSLNeoApa⁺) подготавливали и котрансфецировали аналогично плазмидам TM29. Полученные трансфецированные клетки ресуспендировали и культивировали подобно трансфецированным COS-клеткам TM29.

Для трансфецирования клеток CHO DUX B11 5 мг каждой из плазмид TM29 (как изложено выше) переваривали с рестрикционным ферментом AatII, получая линейный фрагмент ДНК, который преципитировали в этаноле и ресуспендировали в H₂O с концентрацией в 1 мг/мл. Плазмиды затем котрансфецировали в 5x10⁶ клеток посредством электропорации, как описано выше. Трансфецированные клетки ресуспендировали в минимальной поддерживающей среде α (α MEM), дополненной тимидином, аденозином и дезоксиаденозином (неэлективная среда), и помещали в культуру на три дня. Контрольные векторные плазмиды (как изложено выше) подготавливали и котрансфецировали аналогично плазмидам TM29. Полученные трансфецированные клетки ресуспендировали и культивировали подобно трансфецированным CHO-клеткам TM29.

Анализ супернатанта трансфецированных COS-клеток TM29 ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1k}.

После трех дней в культуре трансфецированные COS-клетки TM29 разрастались до слияния. Поэтому супернатант собирали, и клетки выбрасывали в отход. Продуцирование клетками человеческого IgG определялось по культуральному супернатанту использованием ELISA-тестирования на человеческий IgG_{1k}. IgG супернатанта захватывался мышинным Fc-антителом, враждебным к человеческому IgG₁, нанесенным на 96-луночный планшет, и затем обнаруживался с помощью конъюгированного пероксидазой из хрена враждебного человеку козьего IgG_k-антитела и проявления окрашивания от о-фенилендиамина (OPD). Концентрации IgG в супернатанте определяли сравнением замеров оптической плотности с кривой, образованной очищенным человеческим IgG_{1k}, антителом с известной концентрацией. Супернатант трансфецированных COS-клеток TM29 давал концентрацию человеческого IgG в 201,3 нг/мл. Супернатант контрольных ДНК-трансфецированных COS-клеток давал концентрацию IgG в 0 нг/мл.

Отбор трансфецированных CHO-клеток TM29.

После трех дней в культуре трансфецированные CHO-клетки TM разрастались до слияния. Поэтому клетки обрабатывали 0,25% трипсина (в равновесном солевом растворе Хэнка (Hank)) для отделения их от культуральных матрасов. Клетки собирали, центрифугировали, и супернатант удаляли. Дебрис ресуспендировали в избирательной среде α MEM с концентрацией в 2x10⁵ клеток/мл и высевали в 24-луночный планшет (1 мл на лунку). Избирательная среда α MEM имела двойственную селективную способность, не имея нуклеотидных добавок, и имея вместо FBS диализованный FBS, обеспечивающий избирательность к DHFR⁺ на pTCSLHuV_h16GC_hDHFR, и имея добавку Geneticin'a (G-418), обеспечивающего избирательность к неот на pTCSLHuV_h16GC_h1NeoApa⁺.

Клонирование трансфецированных CHO-клеток TM29 конечным разведением.

Три лунки с наиболее высокой продуктивностью по трансфецированным CHO-клеткам TM29 (2C3, 291,9 нг/мл; 2C4, 289,7 нг/мл; 2B6, 289,5 нг/мл) были выбраны для клонирования методом конечного разведения. Для каждой из этих лунок концентрации клеток были разведены в избирательной среде α MEM, и культуры высевали с плотностью в 2 клетки на лунку, 1 клетка на лунку и 0,5 клетки на лунку в 96-луночный планшет. Спустя десять дней после клонирования рост колоний наблюдался во многих лунках каждого из планшетов с плотностью 0,5 клетки на лунку для культур 2C3, 2C4 и 2B6. Затем супернатанты всех лунок от каждого из планшетов с исходной плотностью 0,5 клетки на лунку собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1k}. Все лунки, дающие рост клеток, давали положительные результаты в ELISA-тестировании. Всего 24 лунки из числа наиболее высокопродуктивных (10 от 2C3, 14 от 2B6) были отобраны для размножения в 24-луночном планшете, где они выращивались до слияния. Супернатанты от каждой лунки собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1k}. Концентрация человеческого IgG была в пределах от 0,7 мг/мл до 4,8 мг/мл, со средним значением концентрации в 2,9 мг/мл. Супернатанты от шести лунок с наивысшей продуктивностью по трансфецированным CHO-клонам TM29 (1C7, 1D9, 1G2, 2G1, 2G10, 2H2a), затем анализировали проточной цитометрией. Все шесть проб давали положительное окрашивание клеток Джурката (флуоресценция среднего канала в диапазоне от 313,68 до 356,87) и не давали положительного окрашивания HPB-клеток (флуоресценция среднего канала в пределах от 7,59 до 8,16). Каждую из шести проб размножали в матрасе площадью 25 см², замораживали и хранили в жидком азоте. Три лунки с наиболее высокой продуктивностью (2C3-1G2, 2C3-2G10, 2C3-2H2a) отбирали для субклонирования.

Одну лунку для контрольных трансфецированных CHO-клеток ДНК (3D4) клонировали конечным разведением аналогично лункам с TM29. При разведении клеточной концентрации в 10 раз ниже нужного уровня никакого роста колонии не наблюдалось по истечении десяти дней после клонирования. Поэтому была задействована свежая культура из замороженной ампулы (3D4). Клонирование методом конечного разведения повторяли с использованием этой новой культуры. Спустя шестнадцать дней после клонирования шесть из наиболее конфликтных (слившихся) лунок с планшетов с плотностью в 0,5 клетки на лунку (1B5, 1C11, 1D6, 2E7, 2F3, 2F9) отбирали для размножения в 24-луночном планшете. Каждую лунку последовательно переносили в 25 см²-матрас, а затем в 75 см²-матрас, где культуры выращивали до слияния.

Супернатанты от каждого из матрасов собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к} составляла 0 нг/мл. Каждый матрас затем замораживали и хранили в жидком азоте.

Размножение неклонированных трансфецированных CHO-клеточных культур TM29 в масштабах роллер-флаконов.

Три лунки с наивысшей продуктивностью по трансфецированным CHO-клеткам TM29 (2C3, 291,9 нг/мл; 2C4, 289,7 нг/мл; 2B6, 289,5 нг/мл) также отбирали для размножения в 25 см²-матрасах в качестве неклонированных культур. В это же время по одной ампуле каждой из этих TM29-культур (равно как и одну ампулу контрольной трансфецированной CHO-клеточной культуры TM29) замораживали и хранили в жидком азоте. Каждую из неклонированных культур затем размножали в 75 см²-матрасе. Из одного 75 см²-матраса каждую культуру переносили для размножения в три 75 см²-матраса со снижением концентрации сыворотки в среде α MEM с 10% до 5%. Культуры каждого из 75 см²-матрасов (для 2C3 и 2B6) затем переносили для размножения в двухлитровые роллер-флаконы. Все три 75 см²-матраса с 2C4 замораживали и хранили в жидком азоте. После помещения культур в роллер-флаконы концентрацию сыворотки в среде α MEM снова понижали, с 5% до 1%. После девяти дней культивирования флаконы с 2B6 показывали слияние культур, тогда как флаконы с 2C3 давали приблизительно 25% слияния. Супернатанты из всех флаконов с 2B6 и 2C3 собирали на 9-й, 14-й и 16-й дни, после чего клетки шли в отход. Собранные супернатанты центрифугировали и хранили при -20°C. Аликвоту каждого из трех собранных супернатантов для 2B6 и для 2C3 анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к}. Общее количество содержания человеческого IgG было определено: для 2B6 - 820 мг; для 2C3 - 1923 мг.

Субклонирование трансфецированных CHO-клеток TM29 конечным разведением.

Три лунки с наиболее высокой продуктивностью по клонам трансфецированных CHO-клеток TM29 (2C3 - 1G2, 4,8 мг/мл; 2C3 - 2H2a, 4,1 мг/мл; 2C3 - 2G10, 4,0 мг/мл) были отобраны для субклонирования конечным разведением. Четырнадцать дней спустя после субклонирования рост колоний наблюдался во многих лунках на каждом из планшетов (с 0,5 клетки на лунку) для 1G2, 2G10 и 2H2a. Супернатанты со всех этих лунок, дающих рост колоний, собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к}. Все лунки, где наблюдался рост колоний, давали положительные результаты в ELISA-тестировании на человеческий IgG_{1к}, показывая эффективность клонирования в 100%. Всего 24 лунки с наивысшей продуктивностью (2 от 2H2a, 5 от 2G10, 17 от 1G2) были отобраны для размножения на 24-луночном планшете, где культурам давали расти до слияния. Супернатанты от каждой лунки собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к}. Концентрация человеческого IgG составляла от 1,2 мг/мл до 9,2 мг/мл, со средним значением концентрации в 4,2 мг/мл. Супернатанты от четырех наиболее продуктивных лунок с трансфецированным CHO-субклонами TM29 (2G5, 2H12, 1H6, 2E9) также анализировали проточной цитометрией. Все четыре пробы давали положительное окрашивание клеток Джурката (флуоресценция среднего канала в пределах от 211,51 до 292,45) и не давали положительного окрашивания HPB-клеток (флуоресценция среднего канала от 8,36 до 8,80). Каждую из четырех проб переносили для размножения в 25 см²-матрас.

Второе субклонирование трансфецированных CHO-клеток TM29 конечным разведением.

Два лучших клона трансфецированных CHO-клеток TM29 (2C3-1G2-2G5 и 2C3-1G2-1H6), по совместным результатам ELISA-тестирования и данных проточной цитометрии, были отобраны для второго субклонирования методом конечного разведения. В это же время по одной ампуле с каждым из клонов (равно как и по одной ампуле с 2C3-1G2-2H12 и 2C3-1G2-2E9) замораживали и хранили в жидком азоте. Спустя двенадцать дней после субклонирования рост колоний наблюдался во многих лунках планшетов с исходной плотностью в 0,5 клетки на лунку для 2G5 и 1H6. Затем супернатанты от этих лунок, дающих рост колоний, собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к}. Все лунки, дающие рост колоний, показывали положительные результаты в ELISA-тестировании, давая 100%-ную эффективность клонирования. Всего 24 из числа наиболее продуктивных лунок (20 от 2G5, 4 от 1H6) были отобраны для размножения в 24-луночном планшете (№ 646-101), где культурам давали расти до слияния. Супернатанты собирали от каждой из лунок и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к}. Из-за потери активности используемого в анализе стандарта человеческого IgG_{1к}, уровни концентрации в неизвестных пробах не могли быть определены. Поэтому наиболее высокопродуктивные лунки были определены измерением оптической плотности. Шесть лунок с наиболее высокой продуктивностью (5 от 2G5, 1 от 1H6) были отобраны для переноса на размножение в 25 см²-матрасы и далее в 75 см²-матрасы, где культуры выращивались до слияния. Супернатанты от каждого матраса собирали и анализировали ELISA-тестированием на человеческий IgG_{1к}. Концентрация человеческого IgG была в пределах от 14,6 мг/мл до 21,2 мг/мл, со средним значением концентрации в 18,6 мг/мл. Супернатанты от шести матрасов с трансфецированными CHO-субклонами TM29 (1B5, 1D1, 1F11, 2B10, 2F5, 2F9) затем анализировали проточной цитометрией (№ 646-122). Все шесть проб давали положительное окрашивание клеток Джурката (флуоресценция среднего канала в диапазоне от 304,51 до 383,00) и не давали положительного окрашивания HPB-клеток (флуоресценция среднего канала в пределах от 8,67 до 10,25).

Подготовка замороженного клеточного материала для клона трансфецированных CHO-клеток TM29.

Для подготовки замороженного клеточного материала из трансфецированных CHO-клеток TM29 был отобран клон 2C3-1G2-1H6-2F5. Этот клон из одного 75 см²-матраса размножали в пяти 25 см²-матрасах с целью получения достаточного числа клеток для формирования банка замороженных клеток для исследовательских целей. Банк замороженных клеток был подготовлен в соответствии с требованиями SOP TMB1-001.00. Клетки обрабатывали трипсином, собирали из каждого матраса и объединяли. Содержание клеток с объединенной суспензии было определено в $3,2 \times 10^4$ клеток, с уровнем жизнеспособности в 99%. Были

подготовлены семьдесят две ампулы, каждая из которых содержала 2×10^6 клеток в объеме в 1 мл. Все ампулы для этого клона были маркированы TM29-646-132.

Пример 7.

Последовательности CDR-трансплантированных антител TM29 в сравнении с другими основными областями

TM29 V _κ	
1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVNYYWYQQTPGKAPKLLIYYT
50	
REI	=====Q==QDIIKYLN=====EA
16G8	ENVL====AIM===L=EK==MS=====KSDAS===W====
HIC	E=VL====GT==L=P=ERA=LS====Q==SSSYLA====K==Q==R====GA
51	SNLAPGVPSRFSGSGSGTDYTFISSLPEDIATYYCQQFTSSPFTFGQG
100	
REI	===QA=====YQ=L=Y=====
16G8	=====T=====NS=SL====MEG==A=====S=
HIC	=SR=T=I=D=====F=L===R=E===F=V=====YG===W=====
101	TKLQIT 106
REI	=====
16G8	===E=K
HIC	==VE=K

TM29 V _H	
1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHWVRQAPGKLEWVAY
50	
KOL	Q=====I==SYA=Y=====I
16G8	D=====L====G=RK===AA=====D=====
WEA	Q====D====L=E==G=====A=====AND=N=====LSF
51	ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARRG
100	
KOL	=WDDG=DQH===SV=====D=
16G8	=====P=====T===S===AM=Y=====
WEA	=GGSG=====SV=====NB===S=Y===S===A===A=YY==
101	EGAM
KOL	GHGFCSSASCFGP
16G8	=====
WEA	WLL
	DYWGQGTPVTVSS
	=====
	=====S=====
	N=====L=====

TM29	с последовательностями 1-ой версии
TM29.1	с изменениями SS на AA (23-24)
TM29.2	с изменениями S на P (75)
TM29.3	с изменениями GV/F на AM/Y (92-93/95)

Пример 8.

Анализ Скэтчарда: мАт TM29.

Анализ Скэтчарда для антител TM29 и 16G8 был выполнен в трех независимых экспериментах. Приводимая таблица дает значения K_d, определенные в каждом из экспериментов.

Эксп.	TM29 K _d (M)	16G8 K _d (M)
1	1,45x10 ⁻⁹	2,86x10 ⁻⁹
2	1,65x10 ⁻⁹	2,65x10 ⁻⁹
3	1,15x10 ⁻⁹	2,44x10 ⁻⁹
Среднее значение	1,42x10 ⁻⁹	2,65x10 ⁻⁹

Пример 9.

Краткое изложение работы по химерному TM29.

* Клонирование кДНК V(D)I-областей в векторы экспрессии CHO-клеток, рTCSLNeo(H) и рTCSLDHFR(k), в кДНК-конфигурации.

* Котрансфекция плазмид экспрессии в COS и CHO.

- * Определение концентрации антител в супернатанте от COS-клеток в примерно 35 нг/мл.
- * Анализ CHO-клеточных трансфектантов (методами FACS и ELISA); одноразовое клонирование; амплификация метотрексатом (20 нМ, 100 нМ и 500 нМ).
- * Определение концентрации антитела в неамплифицированных клонах CHO-клеток приблизительно в 3 мкг/мл; положительное окрашивание клеток Джурката. Неамплифицированные клоны замораживаются в жидком азоте.

Пример 10.

Экспрессия химерного 16G8 в COS- и CHO-клетках.

Химерный 16G8.

Конструкции легкой цепи и тяжелой цепи содержали полную мышиную V-область с человеческой константной областью в одних и тех же векторах экспрессии, используемых для CDR-трансплантированных конструкций: рTCS DHFR звено рTCSNeo звено - конструкции имели двойственную избирательную способность.

Трансфектанты COS-клеток - примерно 35 нг/мл.

Трансфектанты CHO-клеток - 16 положительных лунок из 54

	нг/мл	на объем	поправка
1A1	151,6		
1A6		166,6	
1B3	107,2		
1B6	179,6		
1D2	101,0		
1D5	215,1	*	2,2 мкг/мл
2A4	199,8		
2B1	184,5		
2B2	213,8	*	2,1 мкг/мл
2D4	130,6		
2C2		119,6	
2C6	214,4	*	2,1 мкг/мл
2D3	216,6	*	2,2 мкг/мл
2D6	139,7		
3A1	198,7		
3A2	172,2		

все перенесены для размножения в 25 см²-матрасы.

* Выполнена проточная цитометрия.

Пример 11.

Краткое изложение работы по TM29.

TM29

TM29 в COS/CHO:

* Подготовка кДНК из CDR-трансплантированных V-областей в NSO-продуцентной линии; PCR-амплификация; секвенирование.

* Клонирование ДНК-фрагментов в рTCSNeo(H) и рTCSLDHFR(k) в кДНК-конфигурации.

* Котрансфекция плазмид в COS и CHO.

* Определение содержания антитела в супернатанте от COS-клеток примерно в 2 мкг/мл.

* Перед клонированием и амплификацией трансфектанты CHO-клеток секретировали примерно 3 мкг/мл антитела; клетки Джурката положительно окрашивались супернатантом. Подготовка клеточного банка из лучшего неамплифицированного продуцента антитела, после трехразового клонирования.

* Амплификация клеточных линий CHO в различных концентрациях метотрексата.

Пример 12.

Сравнение TM27L, TM27I и TM23 в конкурентном анализе 4H11-ФИТЦ.

Эксп. 1:

Наклон кривой TM23		
Наклон кривой TM27L	=	1,56
Наклон кривой TM23		
Наклон кривой TM27I	=	2,04

Эксп. 2:

Наклон кривой TM23		
Наклон кривой TM27L	=	1,82
Наклон кривой TM23		
Наклон кривой TM27I	=	2,44

Наклон кривой ТМ27I

При сравнении с ТМ23 значения и для ТМ27L, и для ТМ27I имеют коэффициенты менее 3.

Пример 13.

Метотрексатная амплификация ТМ27. Продуктивность (микрограмм/10⁶ клеток/день) Уровень метатрексата (нМ)

		0	20	100	10-200	20-200
C7	*7/30	27	н/о	н/о	н/о	265,8
	*7/22	3,5	н/о	19,2	14,7	34,2
	7/6	2,6	н/о	н/о	9,1	н/о
	6/25	2	4,8	4,5	н/о	н/о
	6/18	3	8,9	н/о	н/о	н/о
H9	*7/30	22,7	н/о	н/о	н/о	181,9
	*7/22	3,9	н/о	9,4	11,6	34,4
	6/25	1,5	1,8	4,7	3,6	н/о
	6/18	1,8	1,5	н/о	н/о	н/о

* Без сравнения между анализами.

Относительные значения сравнения между анализами:

		0	20	100	20-200	20-200
C7	*7/30	1	н/о	н/о	н/о	9,8
	*7/22	1	н/о	5,5	4,2	9,8
	7/6	1	н/о	н/о	3,5	н/о
	6/25	1	2,4	2,3	н/о	н/о
	6/18	1	3,0	н/о	н/о	н/о
H9	*7/30	1	н/о	н/о	н/о	8,0
	*7/22	1	н/о	2,4	3,0	8,8
	6/25	1	1,2	3,1	2,4	н/о
	6/18	1	0,8	н/о	н/о	н/о

Статус:

	0	20	100	20-100	20-200
C7 8/11	fm	fm, s, sf4	fm	fm	fm, s*
H9 8/11	fm	discard	fm, s f2	fm	fm, s*

Примечания:

fm - заморожена 1 пробирка смешанной культуры;
s - субкультура после одного конечного разведения;
s* - первое конечное разведение в стадии осуществления;
f № - заморожено по одной ампуле от каждой лунки № ...;
discard - в отход;
н/о - не определяли.

		10	20	30	40	50
		*	*	*	*	*
TM23	V _L	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISC	SASQG	ISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIYY	
TM27	V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	SASQG	ISNYLN	WYQQTPGKAPKLLIYY	
			CDRI			
		60	70	80	90	100
		*	*	*	*	*
		TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQOYSKLPRTFGG				
		<u>TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISLQPED</u>ATYYCQOYSKLPRTFGQ				
		CDR2			CDR3	
		107				
		*				
		GTKVEIK				
		GTKLQIT				
		10	20	30	40	50
		*	*	*	*	*
TM23	V _H	QVQLKESGPGLVAPSQSL	SITCTVSGFSLT	AYGVN	WVRQPPGKGLEWLGM	
TM27L	V _H	QVQLQESGPGLVLRPSQTL	SLTCTVSGFSLT	AYGVN	WVRQPPGRGLEWLGM	
TM27I	V _H	=====			AYGVN	=====I=M
TM27.1V _H		=====			AYGVN	=====L=M
TM27.2V _H		=====			AYGVN	=====L=M
TM27.3V _H		=====			AYGVN	=====L=M
		CDRI				
		60	70	80	90	100
		*	*	*	*	*
		IWGDGNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD				
		IWGDGNTDYN SALKSRVTMLKDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARD				
		IWGDGNTDYN SALK=====DRV				
		IWGDGNTDYN SALK=====VF=====DRV				
		IWGDGNTDYN SALK==LSIS==N=====DRV				
		<u>IWGDGNTDYN</u> SALK=====R=====DRV				
		CDR2				
		110	120			
		*	*			
		TATLYAMDYWGQGS TVTVSS				
		TATLYAMDYWGQGS LVTVSS				
		TATLYAMDY =====				
		TATLYAMDY =====				
		TATLYAMDY =====				
		<u>TATLYAMDY</u> =====				
		CDR3				

Примечание : CDR = гипервариабельный участок (hv-участок)

Фиг. 1

	10	20	30	40	50
	*	*	*	*	*
16G8 V _L	ENVLTQSPAIMASASLGEKVTMSCRASSSVNYIYWYQQKSDASPKLWIYYT				
TM29 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>CRASSSVNYIYWY</u> QQTTPGKAPKLLIYYT				

CDRI

	60	70	80	90	100
	*	*	*	*	*
	SNLAPGVPTRFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYC <u>QQFTSSPFT</u> FGSG				
	<u>SNLAPGVPS</u> RFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYC <u>QQFTSSPFT</u> FGQG				

CDR2

CDR3

106

*

TKLEIK

TKLQIT

	10	20	30	40	50
	*	*	*	*	*
16G8 V _H	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSNFGMHVWRQAPDKGLEWVAY				
TM29 V _H	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHVWRQAPGKGLEWVAY				
TM29.1V _H	=====AA=====NFGMH=====Y				
TM29.2V _H	=====NFGMH=====Y				
TM29.3V _H	=====NFGMH=====Y				

CDRI

	60	70	80	90	100
	*	*	*	*	*
	ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYICARRG				
	ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARRG				
	ISSGSSTIYYADTLKG=====RG				
	ISSGSSTIYYADTLKG=====P=====RG				
	<u>ISSGSSTIYYADTLKG</u> =====AM-Y== <u>RG</u>				

CDR2

110 117

* *

EGAMDYWGQGTSVTVSS

EGAMDYWGQGPVTVSS

EGAMDY=====

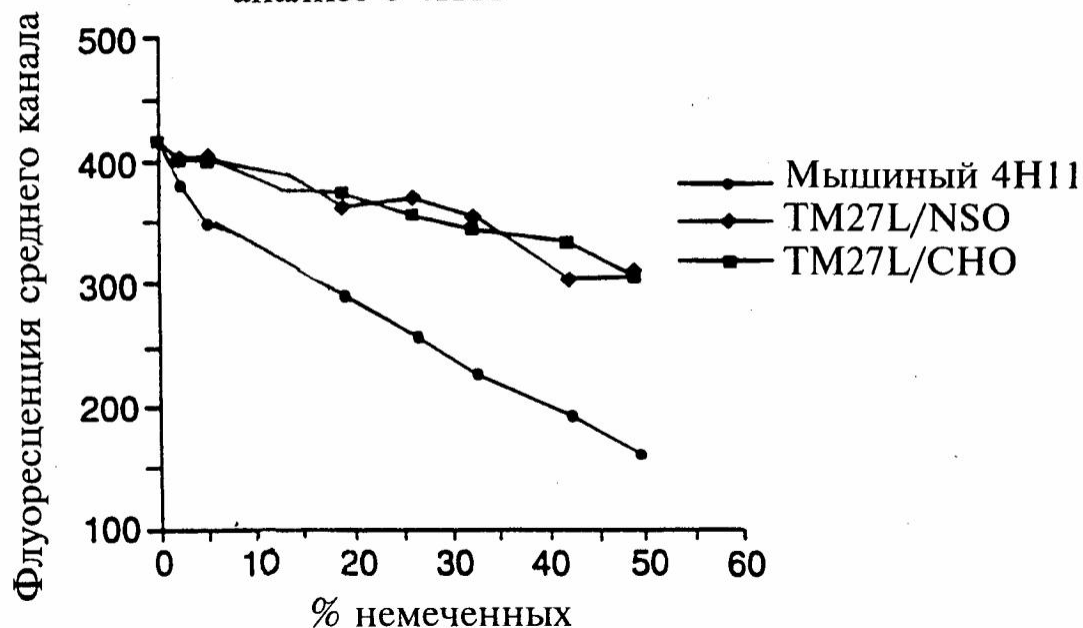
EGAMDY=====

EGAMDY=====

CDR3

Фиг. 2

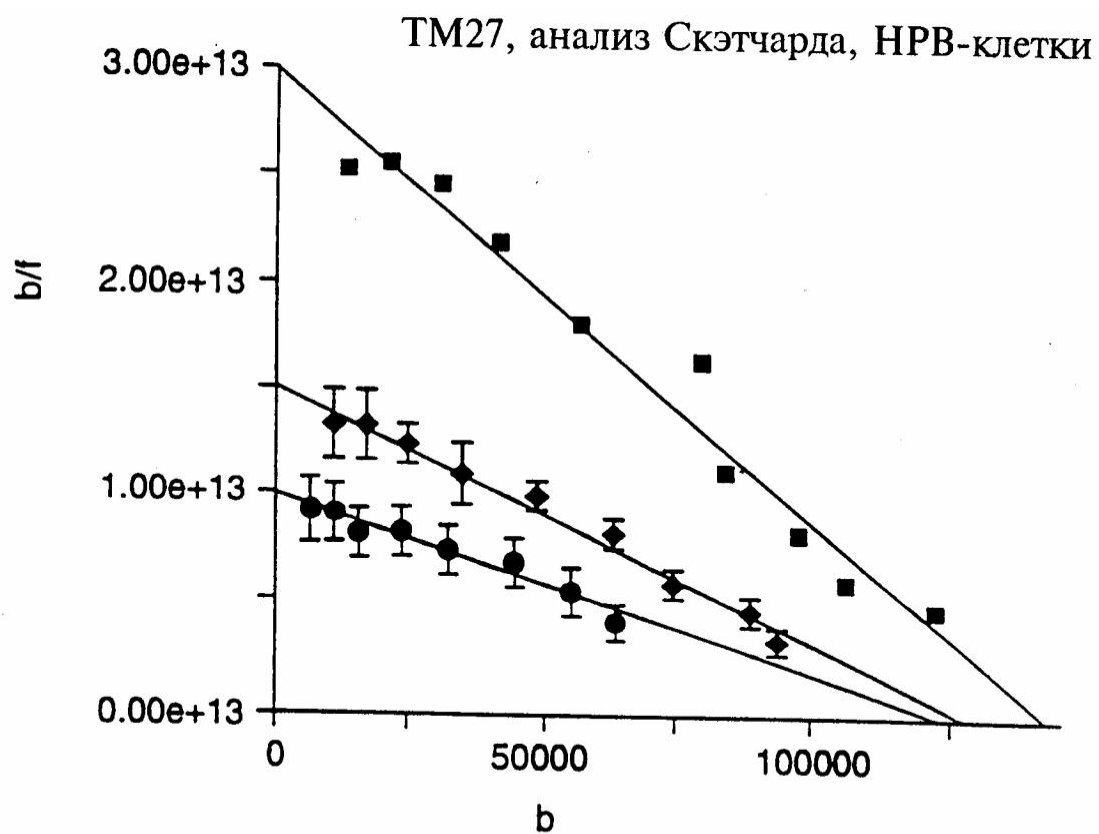
Сравнение TM27L/NSO и
TM27L/CHO в конкурентном
анализе с 4H11



Мышиный 4H11	$y = 393.85 - 5.0535x$	$R^2 = 0.985$
TM27L/NSO	$y = 415.77 - 2.3218x$	$R^2 = 0.939$
TM27L/CHO	$y = 415.64 - 2.1880x$	$R^2 = 0.987$

UG/ML	% немеченных	Мышиный 4H11	TM27L/NSO	TM27L/CHO
5.000	50.000	149.687	303.633	299.073
3.750	42.900	181.330	296.867	328.207
2.500	33.300	219.803	349.850	342.667
1.875	27.300	251.783	367.640	358.120
1.250	20.000	288.993	360.657	374.003
0.938	15.800	308.113	380.870	378.773
0.625	11.100	333.177	388.950	395.623
0.312	5.900	349.383	405.483	401.297
0.156	3.030	380.860	400.113	402.853
0.000	0.000	417.797	417.797	417.792

Фиг. 3



	K_d (nM)
● TM27 CH0	12.3
◆ TM27 NS0	8.2
■ 4H11	4.5

Фиг. 4

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
