

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **021644**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2015.08.31

(21) Номер заявки
200500679

(22) Дата подачи заявки
2003.10.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01)
C12N 5/24 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD20 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 60/419,163; 60/460,028

(32) 2002.10.17; 2003.04.02

(33) US

(43) 2006.02.24

(86) PCT/US2003/033057

(87) WO 2004/035607 2004.04.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(56) A1-20020064823
WO-A2-0212437

(72) Изобретатель:
Телинг Джесика, Руулс Зигрид (NL),
Гленни Мартин (GB), Ван Де Винкель
Ян Г.Й., Паррен Пауль (NL), Петерсен
Йорген (DK), Бодсгорд Оле Д.М.Ск.
(SE), Хуанг Хайчан (US)

(74) Представитель:
Дементьев В.Н. (RU)

(57) В изобретении охватываются человеческие моноклональные антитела, которые связываются с человеческим CD20 и ингибируют его, родственные композиции и молекулы на основе антител. Человеческие антитела можно продуцировать при использовании трансфектомы или в организме отличного от человека трансгенного животного, например в трансгенной мышце, способной продуцировать многие изотипы человеческих моноклональных антител при использовании V-D-J рекомбинации и переключения изотипа. Также охватываются фармацевтические композиции, содержащие человеческие антитела, отличные от человека трансгенные животные и гибридомы, которые продуцируют человеческие антитела и диагностические методы для применения человеческих антител.

B1

021644

021644

B1

Предпосылки создания изобретения

Молекула CD20 (также называемая антигеном ограниченной дифференцировки человеческих В-лимфоцитов, или Bp35) является гидрофобным трансмембранным белком с молекулярным весом около 35 кДа, расположенным на пре-В и зрелых В-лимфоцитах (Valentine et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264(19): 11282-11287 и Einfield et al (1988) *EMBO J.* 7(3):711-717). (Белок) CD20 обнаружен на поверхности более чем 90% В-клеток периферической крови или лимфоидных органов, экспрессируется в процессе раннего развития пре-В-клеток и остается до дифференцировки плазматических клеток. CD20 присутствует как в нормальных В-клетках, так и в злокачественных В-клетках. В частности, CD20 экспрессируется более чем в 90% В-клеток неходжкинской лимфомы (NHL) (Anderson et al. (1984) *Blood* 63(6): 1424-1433), но не обнаруживается в гемопоэтических стволовых клетках, про-В-клетках, нормальных плазматических клетках или других нормальных тканях (Tedder et al. (1985) *J. Immunol.* 135(2):973-979).

Карбоксиконцевая область белка CD20 из 85 аминокислот расположена в цитоплазме. Протяженность этого участка находится в противоречии с протяженностью этих участков других специфических в отношении В-клетки поверхностных структур, таких как тяжелые цепи IgM, IgD и IgG или α - или β -цепи антигенов гистосовместимости антигенов класса II, которые имеют сравнительно короткие внутрицитоплазматические участки из 3, 3, 28, 15 16 аминокислот соответственно (Komagomy et al. (1983) *NAR* 11:6775-6785). Из последних 61 концевых аминокислот 21 являются кислотными остатками и только 2 основными, это указывает на то, что эта область имеет сильный отрицательный заряд (№ в GenBank NP 690605).

Полагают, что CD20 может быть вовлечен в регуляцию ранней стадии(й) в процессах активации и дифференцировки В-клеток (Tedder et al. (1986) *Eur. J. Immunol.* 16:881-887) и может функционировать как кальциевый канал (Tedder et al. (1990) *J. Cell. Biochem.* 14D:195).

Несмотря на неопределенность относительно действительной функции CD20 в стимулировании пролиферации и/или дифференцировки В-клеток, он представляет важную мишень для антителоопосредованной терапии и для киллинга В-клеток, участвующих в раковых заболеваниях и аутоиммунных нарушениях. В частности, экспрессия CD20 на опухолевых клетках, например NHL, делает его важной мишенью антителоопосредованной терапии для специфически нацеленных терапевтических агентов против CD20-позитивных неопластических клеток. Однако, хотя полученные до настоящего времени результаты четко характеризуют CD20 как мишень для иммунотерапии, они также показывают, что доступные в настоящее время мышинные и химерные антитела не являются идеальными химическими агентами.

Следовательно, существует необходимость в усовершенствованных терапевтических антителах против CD20, эффективных для предупреждения и/или лечения ряда заболеваний, включающих клетки, экспрессирующие CD20.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает усовершенствованные антитела-лекарственные вещества для лечения и/или предупреждения заболеваний, ассоциированных с клетками, экспрессирующими CD20, включая заболевания, связанные с опухолями, и иммунные заболевания, в том числе и аутоиммунные заболевания. Антитела, охватываемые изобретением, усовершенствованы (улучшены) в том смысле, что они являются полностью человеческими и, таким образом, являются менее иммуногенными в организме пациентов.

Как показано на примерах в данном описании, человеческие антитела по изобретению опосредуют киллинг В-клеток, экспрессирующих CD20, с помощью различных механизмов. В одном варианте изобретения человеческие антитела по изобретению индуцируют комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), например, по меньшей мере примерно в 20% случаев CDC-опосредованного лизиса, предпочтительно примерно в 30% случаев CDC-опосредованного лизиса и более предпочтительно примерно в 40-50% случаев CDC-опосредованного лизиса, в клетках, таких как клетки хронического В-лимфоцитарного лейкоза (В-CLL, В-ХЛЛ). В другом варианте человеческие антитела по изобретению индуцируют апоптоз клеток, экспрессирующих CD20. В другом варианте человеческие антитела по изобретению индуцируют гомотопическую адгезию клеток, экспрессирующих CD20. Кроме того, человеческие антитела по изобретению могут индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) клеток, экспрессирующих CD20 в присутствии человеческих эффекторных клеток (например, моноцитов, мононуклеаров, NK клеток и PMN). Кроме того, человеческие антитела по изобретению могут индуцировать фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD20 в присутствии макрофагов. Человеческие моноклональные антитела по изобретению могут работать по одному или более этих механизмов. Примеры клеток, которые могут лизироваться антителами по данному изобретению, включают, но без ограничения, В-клетки, экспрессирующие CD20, такие как опухолевые В-клетки и В-клетки, участвующие в иммунных заболеваниях. В конкретном варианте по изобретению человеческие антитела применяются для опосредования киллинга В-лимфоцитов при лечении лимфомы, В-клеточной неходжкинской лимфомы.

Человеческие антитела по изобретению включают IgG1 (например, IgG,к), IgG3 (например, IgG3,к) и IgG4 (например, IgG,к) антитела. Однако другие изоформы антител также охватываются изобретением,

включая IgG2, IgM, IgA1, IgA2, секреторный IgA, IgD и IgE. Антитела могут являться целыми антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, включая, например, Fab, F(ab')₂, Fv, одноцепочечные Fv фрагменты или биспецифические антитела. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты включают химерные (слитые) белки связывающего домена иммуноглобулинов, содержащие (i) полипептид связывающего домена (такой как переменная область тяжелой цепи или переменная область легкой цепи), (ii) CH2 константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с полипептидом шарнирной области, и (iii) CH3 константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с CH2 константной областью. Такие химерные белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно описаны в патентных заявках США 2003/0118592 и 2003/0133939.

Конкретные человеческие антитела по настоящему изобретению включают антитела, названные 11B8, 2F2 и 7D8, кодируемые нуклеиновыми кислотами тяжелой цепи человеческого происхождения и легкой цепи к человеческого происхождения, содержащими нуклеотидные последовательности в их переменных областях, представленных в SEQ ID NO: 1, 5 или 9 и SEQ ID NO: 3, 7 или 11 соответственно, и их модификации консервативной последовательности. В другом варианте изобретения человеческие антитела характеризуются тем, что они включают переменные области тяжелой цепи человеческого происхождения и легкой цепи к человеческого происхождения, содержащие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO: 2, 6 или 10 и SEQ ID NO: 4, 8 или 12 соответственно, и модификации их консервативных последовательностей.

Еще в одном варианте изобретения человеческие антитела характеризуются тем, что они содержат переменные области тяжелой цепи человеческого происхождения и легкой цепи к человеческого происхождения, которые по меньшей мере на 90% гомологичны, предпочтительно по меньшей мере на 95% гомологичны и более предпочтительно по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичны аминокислотным последовательностям, представленным SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 соответственно; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8 соответственно или SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12 соответственно.

Другие конкретные человеческие антитела по изобретению включают антитела, которые содержат CDR домен, имеющий CDR1 область тяжелой и легкой цепей человеческого происхождения, CDR2 область тяжелой и легкой цепей человеческого происхождения и CDR3 область тяжелой и легкой цепей человеческого происхождения, где:

(a) CDR1, CDR2 и CDR3 области тяжелой цепи человеческого происхождения содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, показанных на фиг. 53, 55 или 57 (SEQ ID NO: 13-15, 19-21 и 25-27), и модификаций их консервативных последовательностей, и

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 области легкой цепи человеческого происхождения содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, показанных на фиг. 53, 55 или 57 (SEQ ID NO: 16-18, 22-24 и 28-30), и модификаций их консервативных последовательностей.

Также настоящее изобретение включает антитела, которые диссоциируют из CD20 с равновесной константой диссоциации (K_D) около 1-10 нМ или ниже. Такие антитела также включают антитела, которые не реагируют перекрестно с родственными антигенами клеточной поверхности и, таким образом, не ингибируют их функцию.

В другом варианте изобретения человеческие антитела против CD20 по настоящему изобретению можно охарактеризовать одним или более следующих свойств:

- a) специфичность в отношении человеческих CD20;
- b) аффинность связывания с CD20 (K_D) около 10 нМ или ниже, предпочтительно около 5 нМ или ниже и более предпочтительно около 1-3 нМ или ниже по определению с помощью эксперимента по связыванию, представленному в примере 5 (фиг. 9) по данному описанию;
- c) константа скорости диссоциации (k_d) их ассоциата с CD20 равна около 10^{-4} c^{-1} или менее, предпочтительно около 10^{-5} c^{-1} или менее и более предпочтительно около 10^{-6} c^{-1} по определению с помощью эксперимента по связыванию, представленному в примере 5 (фиг. 9) по данному описанию;
- d) способность опосредовать высокий уровень CDC либо на CD55/59 негативных, либо на CD55/59 позитивных клетках;
- e) способность к транслокации в липидные рафты ("липидные плоты") при связывании с CD20;
- f) способность ингибировать рост клеток, экспрессирующих CD20;
- g) способность индуцировать апоптоз клеток, экспрессирующих CD20;
- h) способность индуцировать гомотопическую адгезию клеток, экспрессирующих CD20;
- i) способность индуцировать ADCC клеток, экспрессирующих CD20 в присутствии эффекторных клеток;
- j) способность пролонгировать выживание субъекта, имеющего опухолевые клетки, экспрессирующие CD20;
- k) способность истощать клетки, экспрессирующие CD20; и/или

1) способность истощать клетки, экспрессирующие низкие уровни CD20 (CD20^{low} клетки).

Человеческие антитела против CD20 по настоящему изобретению могут быть дериватизированными, связанными с или коэкспрессирующимися с другими специфичностями связывания. В особом варианте изобретение включает биспецифичную или полиспецифичную молекулу, содержащую по меньшей мере одну первую специфичность связывания CD20 (например, человеческое антитело против CD20 или его миметик) и вторую специфичность связывания человеческой эффекторной клетки, такую как специфичность связывания Fc-рецептора (например, человеческого Fcγ рецептора, такого как FcγRI, или человеческого Fcα рецептора) или T-клеточного рецептора, например CD3.

Следовательно, настоящее изобретение включает биспецифические и полиспецифические молекулы, которые связываются как с человеческим CD20, так и с Fc-рецептором, например CD3. Примерами Fc-рецепторов являются, например, рецептор человеческого IgG, например Fc-гамма рецептор (FcγR), такой как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). Также могут быть нацеленными другие Fc-рецепторы, такие как рецепторы человеческого IgA (например, FcαRI). Fc-рецептор предпочтительно локализован на поверхности эффекторной клетки, например моноцита, макрофага или активированного мононуклеара. В предпочтительном варианте изобретения биспецифичные и моноспецифичные молекулы связываются с Fc-рецептором по сайту, отличному от сайта связывания рецептора Fc иммуноглобулина (например, IgG или IgA). Следовательно, связывание биспецифичных и полиспецифичных молекул не блокируется физиологическими уровнями иммуноглобулинов.

Еще в одном аспекте человеческие антитела против CD20 по изобретению являются дериватизированными, связанными или коэкспрессирующимися с другой функциональной молекулой, например пептидом или белком (например, Fab' фрагментом). Например, антитело по изобретению может быть функционально связано (например, химической связью, генетическим слиянием, нековалентной ассоциацией или другим способом) с одним или более других молекулярных объектов, таких как другое антитело (например, с образованием биспецифичного или полиспецифичного антитела), цитотоксин, клеточный лиганд или антиген (например, с образованием иммуноконъюгата, такого как иммунотоксин). Антитело по данному изобретению может быть связано с другими терапевтическими частицами, например, радиоизотопом, низкомолекулярным (малая молекула) противораковым лекарственным веществом, противовоспалительным агентом или иммуносупрессором. Соответственно настоящее изобретение охватывает большой ряд конъюгатов антитела, биспецифичных или полиспецифичных молекул и химерных (слитых, гибридных) белков, причем все они связываются с клетками, экспрессирующими CD20, и всех их можно использовать для нацеливания других молекул на такие клетки.

Еще в одном аспекте изобретение включает композиции, например фармацевтические и диагностические композиции/наборы, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, приготовленный с одним человеческим моноклональным антителом или с комбинацией человеческих моноклональных антител. В особом варианте изобретения композиция включает комбинацию антител, которые связываются с различными эпитопами или которые обладают различными функциональными характеристиками, таких как индуцирующие CDC и индуцирующие апоптоз.

Человеческие антитела, иммуноконъюгаты, биспецифичные и полиспецифичные молекулы и композиции по настоящему изобретению можно использовать в различных методах для ингибирования роста клеток, экспрессирующих CD20, и/или киллинга клеток, экспрессирующих CD20, путем контактирования клеток с эффективным количеством антитела, иммуноконъюгата, биспецифичной/полиспецифичной молекулы или композиции, так что рост клетки ингибируется и/или клетка гибнет. В одном варианте изобретения способ включает киллинг клетки, экспрессирующей CD20, в присутствии эффекторных клеток, например, с помощью CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза или комбинацией двух или более из этих механизмов. Предпочтительно клетки лизируют или ингибируют, не убивая или не ингибируя активность клеток, которые не экспрессируют CD20, но которые могут, например, экспрессировать родственный по структуре антиген клеточной поверхности (т.е. без кросс-реактивности с родственными, но функционально отличными антигенами клеточной поверхности). Клетки, экспрессирующие CD20, которые можно ингибировать или убить, используя человеческие антитела по изобретению, включают, например, опухолегенные В-клетки.

Следовательно, человеческие антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения и/или предупреждения различных заболеваний, включающих клетки, экспрессирующие CD20, путем введения антител пациентам, страдающим такими заболеваниями. Примеры заболеваний, которые можно лечить (например, облегчать) или предупреждать, включают, но без ограничения, опухолегенные заболевания и иммунные заболевания, например аутоиммунные заболевания. Примеры опухолегенных заболеваний, которые можно лечить и/или предупреждать, включают В-клеточную лимфому, например NHL, в том числе В-лимфобластный лейкоз/лимфому из клеток-предшественников и опухоли из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/малая лимфоцитарная лимфома (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмацитарная лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярная лимфома (FL), включая FL низкой, средней и высокой степени злокачественности, кожная лимфома из клеток фолликулярных центров, В-клеточная лимфома

из клеток маргинальной зоны (MALT тип, узловой тип, селезеночный тип), волосатоклеточный лейкоз, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома Беркита, плазмацитома, миелома из плазматических клеток, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемия Вальденстрема и анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL). Примеры иммунных расстройств, в которых участвуют В-клетки, экспрессирующие CD20, которые можно лечить и/или предупредить, включают псориаз, псориатический артрит, дерматит, системную склеродерму и склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс-синдром, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзему, астму, атеросклероз, недостаточность адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Сегрена, ювенильный диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, иммунный комплексный нефрит, IgA нефропатию, IgM полинейропатию, иммунные тромбоцитопении, такие как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическую анемию, тяжелую псевдопаралитическую миастению, волчаночный нефрит, системную красную волчанку, ревматоидный артрит (RA), атопический дерматит, пузырчатку, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, гранулематоз Вегенера, синдром Оменна, хроническую почечную недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ и заболевания, ассоциированные в вирусом герпеса. Дополнительными примерами являются тяжелый острый респираторный дистресс-синдром и хореоретинит. Другими дополнительными примерами являются заболевания и нарушения, вызванные инфицированием В-клеток вирусом, таким как вирус Эпштейн-Барра (EBV).

В особом варианте изобретения субъекта, которому вводят антитело, дополнительно лечат химиотерапевтическим агентом, облучением или агентом, который модулирует, т.е. повышает или ингибирует, экспрессию или активность Fc-рецептора, Fc α рецептора или Fc γ рецептора, таким как цитокин. Типичные цитокины для введения в процессе лечения включают гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон- γ (IFN- γ) и фактор некроза опухолевых клеток (TNF). Типичные терапевтические агенты включают, среди прочих, противоопухолевые агенты, такие как доксорубин, цисплатин, блеомицин, кармустин, хлорамбуцил и циклофосфамид.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение охватывает способ обнаружения *in vitro* или *in vivo* присутствия в образце или индивидуально CD20, например, для диагностирования связанных с CD20 заболеваний предпочтительно на ранней стадии. Это также может быть полезно для мониторинга заболевания и эффекта лечения и для определения и корректировки дозы вводимого антитела. *In vivo* метод можно осуществлять, используя методику визуализации, такую как PET (позитронно эмиссионная томография) или SPECT (единичная фотонно-эмиссионная компьютерная томография). В одном варианте изобретения визуализацию осуществляют путем контактирования тестируемого образца, необязательно наряду с контрольным образцом, с человеческим моноклональным антителом по изобретению в условиях, которые делают возможным образование комплекса антитела и CD20. Затем детектируют образование комплекса (например, с помощью FACS анализа или вестерн-блоттинга). Если наряду с тестируемым образцом используют контрольный образец, комплекс обнаруживают в обоих образцах, и любая статистически значимая разница между образцами в образовании комплексов является показателем присутствия в тестируемом образце CD20.

Еще в одном аспекте изобретение охватывает трансгенное отличное от человека животное, такое как трансгенная мышь, которое экспрессирует человеческие моноклональные антитела, которые связываются с CD20. В особом варианте изобретения трансгенное, не являющееся человеком животное представляет собой трансгенную мышь, имеющую геном, содержащий трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения и трансген с легкой цепью человеческого происхождения, кодирующие все антитело по изобретению или его фрагмент. Трансгенное отличное от человека животное можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом CD20 антигена и/или клеток, экспрессирующих CD20. Предпочтительно трансгенное отличное от человека животное, например трансгенная мышь, способно продуцировать многие изотипы человеческих моноклональных антител к CD20 (например, IgG, IgA и/или IgM) при использовании V-D-J рекомбинации и переключении изотипа. Переключение изотипа может осуществляться с помощью классического или неклассического переключения изотипа.

Соответственно еще в одном аспекте изобретение охватывает выделенные В-клетки трансгенного отличного от человека животного, описанного выше, например трансгенной мыши, которая экспрессирует человеческие антитела против CD20. Выделенные В-клетки могут затем быть иммортализованы путем слияния с иммортализованной клеткой для создания источника (например, гибридомы) человеческих антител против CD20. Такие гибридомы (т.е. те, которые продуцируют человеческие антитела против CD20) также входят в объем настоящего изобретения.

Как показано в примерах по данному описанию, человеческие антитела по изобретению можно получать непосредственно при использовании гибридом, которые экспрессируют антитело, или можно клонировать и рекомбинантно экспрессировать в клетке-хозяине (например, в CHO клетке, NS/0 клетке или лимфоците). Другими примерами клеток-хозяев являются микроорганизмы, такие как *E. coli* и гри-

бы, такие как дрожжи. Или же, их можно получать методами рекомбинантной ДНК в трансгенном отличном от человека животном или растении. Соответственно в другом аспекте настоящее изобретение охватывает методы получения моноклональных антител, которые связываются с человеческим CD20. В одном варианте изобретения метод включает иммунизацию трансгенного животного, отличного от человека, например трансгенной мыши, описанной ранее (например, имеющей геном, содержащий трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения и трансген с легкой цепью человеческого происхождения, кодирующие все антитело против CD20 или его фрагмент), очищенным или обогащенным препаратом человеческого CD20 антигена и/или клеток, экспрессирующих человеческий CD20. Затем получают В-клетки (например, В-клетки селезенки) животного и сливают с клетками миеломы для образования бессмертных гибридных клеток, которые секретируют человеческие моноклональные антитела против CD20.

Еще в одном аспекте изобретение включает нуклеотидные молекулы, кодирующие человеческие антитела против CD20 (например, их вариабельные области), а также рекомбинантные векторы экспрессии, которые включают нуклеиновые кислоты по изобретению, и клетки-хозяева, трансфицированные при использовании таких векторов. Методы получения антител с помощью культивирования этих клеток-хозяев также охватываются данным изобретением. Конкретные нуклеиновые кислоты по изобретению содержат нуклеотидные последовательности, показанные SEQ ID NO: 1, 5 или 9 и SEQ ID NO: 3, 7 или 11, кодирующих тяжелую и легкую цепи соответственно человеческих антител 2F2, 7D8 и 11B8 против CD20.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеприведенного подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан вектор pCON γ 1f/вариабельная (область)-тяжелая (цепь), используемый для рекомбинантного продуцирования человеческих моноклональных антител 2F2 и 11B8.

На фиг. 2 показан вектор pCON γ 1f/вариабельная (область)-тяжелая (цепь), используемый для рекомбинантного продуцирования 2F2 и 11B8.

На фиг. 3 показан двугенный вектор клонирования (pCON γ 1f/k2A2), используемый для рекомбинантного продуцирования 2F2 и 11B8.

На фиг. 4 изображен график сравнения определенного методом проточной цитометрии связывания человеческих антител 2F2, 7D8 и 11B8 с клетками NS/0, трансфицированными при использовании Raji, Daudi и CD20, и родительскими NS/0 клетками.

На фиг. 5A и 5B показано определенное методом проточной цитометрии связывание 2F2 с PBMC у трех доноров-людей.

На фиг. 6 изображен график, на котором сравниваются аффинности связывания меченого ^{125}I 2F2 и меченого ^{125}I 11B8 с клетками Ramos-EHRB.

На фиг. 7A и 7B показано связывание меченого ^{125}I 2F2 и меченого ^{125}I 11B8 по сравнению с меченым ^{125}I ритуксимабом (химерное антитело против CD20, IDEC) и меченым ^{125}I B1 (термин B1 соответствует немеченой форме ВеххагTM, которое представляет собой меченное ^{131}I мышинное антитело против человеческого CD20, Coulter) с клетками Ramos-EHRB (A) и клетками Daudi (B).

На фиг. 8 показан график сравнения скорости диссоциации меченого ^{125}I 11B8T, меченого ^{125}I 2F2, меченого ^{125}I ритуксимаба (RIT) и меченого ^{125}I B1.

На фиг. 9 показаны скорости диссоциации F(ab')₂ фрагментов 2F2, 11B8T и ритуксимаба в клетках Ramos-EHRB.

На фиг. 10A и 10B показана CDC (комплементзависимая цитотоксичность), индуцированная 2F2, 11B8T, ритуксимабом и изотипом контрольного антитела (HuMad-KLH), клеток Daudi (A) и клеток SU-DHL-4 (B) в различных временных точках (функциональная "off-rate"), определяемая методом проточной цитометрии.

На фиг. 11A-E показана кинетика CDC, индуцированной 2F2 и ритуксимабом в различных клеточных линиях, определяемая с применением проточной цитометрии.

На фиг. 12A-D показана кинетика CDC, индуцированной 2F2 и ритуксимабом в различных клеточных линиях, как функция концентрации комплемента (нормальной человеческой сыворотки (NHS)) при двух различных концентрациях антитела, определяемая с применением проточной цитометрии.

На фиг. 13A-D показана зависимость от концентрации индукция CDC, индуцированной 2F2 и ритуксимабом в различных клеточных линиях, определяемая с применением проточной цитометрии.

На фиг. 14A и 14B показана зависимость от концентрации индукция CDC, вызываемая 2F2, 2F2T, 11B8T, B1 и ритуксимабом в клетках Daudi (A) и Raji (B), определяемая с применением проточной цитометрии.

На фиг. 15A и 15B показаны графики сравнения CDC (клеточной цитотоксичности) клеток Daudi (клеток, экспрессирующих низкие уровни CD55/59), вызываемой человеческими моноклональными антителами 2F2, 7D8 и 11B8T и ритуксимабом; график (A) показывает лизис неотмытых клеток в процентах, а график (B) показывает лизис клеток, отмытых перед прибавлением сыворотки, в процентах.

На фиг. 16А и 16В показаны графики сравнения CDC клеток Raji (клеток, экспрессирующих высокие уровни CD55/59), вызываемой человеческими моноклональными антителами 2F2, 7D8, 11B8T, B1 и ритуксимабом; график (А) показывает лизис (в процентах) клеток, не заблокированных антителами против CD55 и против CD59, а график (В) показывает лизис клеток, заблокированных антителами против CD55 и против CD59, в процентах.

На фиг. 17А-С показана роль CD55 и CD59 в CDC, индуцированной 2F2 и ритуксимабом в клетках Raji. На фиг. (А) показан процент клеток, лизированных при добавлении антитела против CD55; на фиг. (В) показан процент клеток, лизированных при добавлении антитела против CD59, а график (С) показывает процент клеток, лизированных при добавлении как антитела против CD55, так и антитела против CD59.

На фиг. 18А-Д показано связывание фактора комплемента C1q при использовании 2F2 и ритуксимаба в различных клеточных линиях, определяемая проточной цитометрией.

На фиг. 19А-Д показано отложение фрагмента фактора комплемента C4с с помощью 2F2 и ритуксимаба в различных клеточных линиях, определяемая проточной цитометрией.

На фиг. 20 показан лизис клеток ARH-77 с помощью 2F2, ритуксимаба и 11B8T в присутствии PMN, MNC, плазмы или цельной крови.

На фиг. 21 показан лизис клеток В-CLL с помощью 2F2, ритуксимаба и 11B8T в присутствии PMN, MNC, плазмы или цельной крови.

На фиг. 22 показан лизис клеток HCL (волосатоклеточной лейкемии) с помощью 2F2, ритуксимаба и 11B8T в присутствии PMN, MNC, плазмы или цельной крови.

На фиг. 23 показан лизис клеток В-ALL с помощью 2F2, ритуксимаба и 11B8T в присутствии PMN, MNC, плазмы или цельной крови.

На фиг. 24 показан лизис клеток фолликулярной лимфомы с помощью 2F2, ритуксимаба и 11B8T в присутствии PMN, MNC, плазмы или цельной крови.

На фиг. 25 показан лизис клеток лимфомы из клеток мантийной зоны с помощью 2F2, ритуксимаба и 11B8T в присутствии PMN, MNC, плазмы или цельной крови.

На фиг. 26 показан зависимый от концентрации лизис клеток ARH-77 с помощью 2F2 и ритуксимаба в присутствии цельной крови.

На фиг. 27 показан опосредованный MNC лизис клеток ARH-77 с помощью 2F2, 11B8T и ритуксимаба.

На фиг. 28 показан опосредованный MNC лизис Raji клеток с помощью 2F2, 11B8T и ритуксимаба.

На фиг. 29А-С даны графики, показывающие образование кластеров CD20 в липидных рафтах ("липидных плотках") при инкубации с 2F2, 7D8 или 11B8T, построенные с помощью FRET анализа и анализа нерастворимости с Тритоном-Х.

На фиг. 30 показано образование кластеров CD20 в липидных рафтах ("липидных плотках") при инкубации с 2F2, ритуксимабом или 11B8T, построенные с помощью FRET анализа.

На фиг. 31 показано соотношение CD20, остающегося в нерастворимой фракции рафта (плота) после обработки Тритоном-Х-100 (ТХ) и инкубации с 2F2, ритуксимабом и 11B8T.

На фиг. 32 показано распределение CD20 между "рафтовой" и "нерафтовой" мембранными фракциями при стимулировании клеток Daudi 2F2, ритуксимабом и 11B8T.

На фиг. 33А-Г показан апоптоз клеток Daudi с помощью 2F2, 7D8 и 11B8T, определяемый проточной цитометрией.

На фиг. 34 показана индукция апоптоза клеток Raji с помощью 2F2, 11B8T, ритуксимаба или B1, определяемая проточной цитометрией.

На фиг. 35А показана индукция апоптоза клеток Daudi с помощью 2F2, 11B8T, ритуксимаба или B1, определяемая проточной цитометрией.

На фиг. 35В показан апоптоз клеток Daudi на ранней и поздней стадии с помощью 2F2, 11B8T, ритуксимаба или B1, определяемый проточной цитометрией.

На фиг. 36А-Е показана гомотипическая адгезия клеток Ramos-EHRB при использовании 2F2, 7D8 и 11B8T, определяемая с помощью оптической спектроскопии.

На фиг. 37 показана гомотипическая адгезия клеток Daudi при использовании 2F2, ритуксимаба и B1, определяемая с помощью оптической спектроскопии.

На фиг. 38 дан график, показывающий процент выживания мышей SCID, которым инъецированы клетки Daudi и которые обработаны 2F2 или 7D8.

На фиг. 39 дан график, показывающий процент выживания мышей SCID, которым инъецированы клетки Тапоце и которые обработаны 2F2, ритуксимабом или B1.

На фиг. 40 показан процент выживания мышей SCID, которым инъецированы клетки Daudi и которые обработаны различными концентрациями 2F2 или ритуксимаба.

На фиг. 41 показан процент выживания мышей SCID, которым инъецированы клетки Daudi и которые обработаны 11B8T или B1.

На фиг. 42 дана биолюминесцентная визуализация опухолевых клеток у мышей SCID в день 39 (день 31 после введения 10 мкг B1, ритуксимаба, 11B8T, 2F2Т или huIgG). Биолюминесценция представ-

лена красным цветом (темные участки на изображении мышей) (интенсивность света > 50 фотонов за 5 мин) как перекрывание черного и белого на изображении мышей.

На фиг. 43 показана массы опухоли у каждой мыши, количественно определяемая интегрированием световых сигналов от поверхности тела в день 25, 32, 39 и 46 после введения, в день 8, 10 мкг В1, ритуксимаба, 11В8Т, 2F2Т или huIgG.

На фиг. 44А-С показан проточно-цитометрический анализ клеток CD20 в периферической крови обезьян *Synomolgus* после внутривенного введения различных доз - 4×1.25 мг/кг (А), 4×6.25 мг/кг (В) или 4×12.50 мг/кг (С) - 2F2 или ритуксимаба.

На фиг. 45А-С показан проточно-цитометрический анализ клеток CD21⁺ в периферической крови обезьян *Synomolgus* после внутривенного введения различных доз - 4×1.25 мг/кг (А), 4×6.25 мг/кг (В) или 4×12.50 мг/кг (С) - 2F2 или ритуксимаба.

На фиг. 46А-С показан проточно-цитометрический анализ клеток CD20⁺ в лимфатических узлах обезьян *Synomolgus* после внутривенного введения различных доз - 4×1.25 мг/кг (А), 4×6.25 мг/кг (В) или 4×12.50 мг/кг (С) - 2F2 или ритуксимаба.

На фиг. 47А-С показан проточно-цитометрический анализ CD20^{low}CD23⁺CB40^{high} экспрессирующих клеток в периферической крови обезьян *Synomolgus* после внутривенного введения различных доз - 4×1.25 мг/кг (А), 4×6.25 мг/кг (В) или 4×12.50 мг/кг (С) - 2F2 или ритуксимаба.

На фиг. 48А-Е показано связывание ритуксимаба (А), 2F2 (В), 11В8Т (С), В1 (D) или изотипа контрольного антитела (Е) с клетками CHO, экспрессирующими дикого типа (WT) CD20, мутантный CD20 (AxP) или как WT CD20, так и мутантный CD20 (AxP), определяемое проточной цитометрией.

На фиг. 49А-Ф показан процент связывания 2F2, 11В8Т, В1 или ритуксимаба с мутантным P172S vs WT CD20 (А), процент связывания 2F2, 11В8Т, В1, CAT (CAT 12.6E12, мышинное моноклональное IgG2A антитело против CD20, Diatec.Com.), изотипа контрольного антитела (KLH) или ритуксимаба с мутантным CD20 (AxP) vs WT CD20 (В), процент связывания 2F2, 11В8Т, В1 или ритуксимаба с мутантным N166D vs WT CD20 (С), процент связывания 2F2Т, CAT или ритуксимаба с мутантным N166D vs WT CD20 (D), процент связывания 2F2Т, 2F2, 11В8Т, В1 или ритуксимаба с мутантным N1663D vs WT CD20 (Е) и процент связывания 2F2Т, CAT или ритуксимаба с мутантным N163D vs WT CD20(Ф).

На фиг. 50 показано связывание 2F2Т, 7D8 и изотипа контрольного антитела по определению методом ELISA с тремя антиидиотипическими антителами, анти-2F2 sab 1.1, анти-2F2 sab 1.2 и анти-2F2 sab 1.3, специфичными к 2F2.

На фиг. 51 показано связывание 11В8Т по определению методом ELISA с тремя антиидиотипическими антителами, анти-11В8Т sab 2.2, анти-11В8Т sab 2.3, анти-11В8Т sab 2.4, анти-11В8Т sab 2.5, анти-11В8Т sab 2.6, специфичное к 11В8Т, но не связывание с антиидиотипическими антителами против 2F2.

На фиг. 52А-С показано зависящее от дозы связывание 2F2Т по определению методом ELISA с тремя антиидиотипическими антителами, анти-2F2 sab 1.1 (А), анти-2F2 sab 1.2(В) и анти-2F2 sab 1.3 (С), специфичными к 2F2.

На фиг. 53 показаны аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2) V области тяжелой цепи и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4) V области легкой (κ) цепи человеческого моноклонального антитела 2F2 с обозначенными CDR областями.

На фиг. 54 показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1) V области тяжелой цепи и нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 3) V области легкой (κ) цепи человеческого моноклонального антитела 2F2.

На фиг. 55 показаны аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 6) V области тяжелой цепи и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:8) V области легкой (κ) цепи человеческого моноклонального антитела 7D8 с обозначенными CDR областями.

На фиг. 56 показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:5) V области тяжелой цепи и нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:7) V области легкой (κ) цепи человеческого моноклонального антитела 7D8.

На фиг. 57 показаны аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 10) V области тяжелой цепи и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 12) V области легкой (κ) цепи человеческого моноклонального антитела 11В8 с обозначенными CDR областями.

На фиг. 58 показаны нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:9) V области тяжелой цепи и нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 11) V области легкой (κ) цепи человеческого моноклонального антитела 11В8.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение охватывает усовершенствованную "антительную" терапию для лечения и диагностирования нарушений, включающих клетки, экспрессирующие CD20. Терапия по изобретению применяет выделенные человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопом в CD20. Выделенные человеческие моноклональные антитела, охватываемые настоящим изобретением, включают антитела IgA, IgG4, IgE, IgM и IgD.

В одном варианте изобретения антитело является IgG1 антителом, более конкретно, IgG1,κ или

IgG1, λ изотипа. В другом варианте изобретения антитело является IgG3 антителом, более конкретно, IgG3, κ или IgG3, λ изотипа. Еще в одном варианте изобретения антитело является IgG4 антителом, более конкретно, IgG4, κ или IgG4, λ изотипа. Еще в одном варианте изобретения антитело является IgA1 или IgA2 антителом.

Еще в одном варианте изобретения антитело является IgM антителом.

В одном варианте изобретения человеческие антитела продуцируются в отличном от человека трансгенном животном, например в трансгенной мышце, способном продуцировать множество изотипов человеческих моноклональных антител к CD20 при использовании V-D-J рекомбинации или переключения изотипа. Соответственно аспекты по изобретению включают не только антитела, фрагменты антител и их фармацевтические композиции, но также отличных от человека трансгенных животных, В-клетки, трансфектомы клеток-хозяев и гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела. Такое трансгенное животное может также быть трансгенным кроликом для продуцирования поликлональных антител, таких как поликлональные антитела, описанные в патентной заявке США 2003/0017534. Соответственно изобретение также охватывает человеческие поликлональные антитела, которые специфически связываются с CD20. В одном варианте изобретение относится к поликлональным антителам, которые связываются с эпитопом на CD20 (i), который не содержит или которому не требуется аминокислотный остаток пролин в положении 172; (ii) который не содержит или которому не требуются аминокислотные остатки аланин в положении 170 или пролин в положении 172; (iii) который содержит или которому требуются аминокислотные остатки аспарагин в положении 163 и аспарагин в положении 166; (iv) который не содержит или которому не требуется аминокислотный остаток пролин в положении 172, но который содержит или которому требуются аминокислотные остатки аспарагин в положении 163 и аспарагин в положении 166; или (v) который не содержит или которому не требуются аминокислотные остатки аланин в положении 170 или пролин в положении 172, но который содержит или которому требуются аминокислотные остатки аспарагин в положении 163 и аспарагин в положении 166.

В другом варианте изобретение относится к человеческим поликлональным антителам, которые имеют одну или более из следующих характеристик: (i) связываются с мутантным P172S CD20 (пролин в положении 172 заменяется на серин), по меньшей мере, с такой же аффинностью, как и с человеческим CD20; (ii) связываются с мутантным AxP (аланин в положении 170 заменен на серин и пролин в положении 172 заменен на серин), по меньшей мере, с такой же аффинностью, как и с человеческим CD20; (iii) показывают пониженное на 50% или более связывание с мутантным N166D (аспарагин в положении 166 заменен на аспарагиновую кислоту) по сравнению с человеческим CD20 при концентрации антитела 10 мкг/мл; и/или (iv) показывают пониженное на 50% или более связывание с мутантным N163D (аспарагин в положении 163 заменен на аспарагиновую кислоту) по сравнению с человеческим CD20 при концентрации антитела 10 мкг/мл.

Еще в одном варианте изобретение относится к человеческим моноклональным антителам, которые связываются с эпитопом в малой первой внеклеточной петле человеческого CD20. Еще в одном варианте изобретение охватывает также человеческие моноклональные антитела, которые связываются с прерывистым эпитопом на CD20. Еще в одном варианте изобретение относится к человеческим моноклональным антителам, которые связывают прерывистый эпитоп на CD20, который содержит участок первой малой внеклеточной петли и участок второй внеклеточной петли. Еще в одном варианте изобретение относится к человеческим поликлональным антителам, которые связываются с прерывистым эпитопом на CD20, содержащим остатки AGIYAP малой первой внеклеточной петли и остатки MESLNFIRANTPYI второй внеклеточной петли.

Изобретение охватывает способы применения антител по изобретению для обнаружения клетки, экспрессирующей CD20. Также охватываются способы применения антител по изобретению для блокирования или ингибирования индуцированных CD20 активностей, например пролиферативной активности и/или активности дифференцировки, и эти методы применимы для лечения нарушений, ассоциированных с CD20, таких как опухолегенные заболевания (например, В-клеточная лимфома) и аутоиммунные заболевания (например, РА (ревматоидный артрит, РА), болезнь Крона и гранулематоз Вегенера).

Для того чтобы лучше понять настоящее изобретение, сначала дается определение некоторых терминов. Дополнительные определения вводятся в ходе подробного описания.

Термины "CD20" и "антиген CD20" применяются поочередно в данном описании и включают любые варианты, изоформы и гомологи человеческого CD20, которые естественно экспрессируются клетками или экспрессируются в клетках, трансфицированных геном CD20. Связывание антитела по изобретению с антигеном CD20 опосредует киллинг клеток, экспрессирующих CD20 (например, опухолевых клеток) путем инактивации CD20. Киллинг клеток, экспрессирующих CD20, может происходить по одному или более следующих механизмов:

- комплементзависимая цитотоксичность (CDC) клеток, экспрессирующих CD20;
- апоптоз клеток, экспрессирующих CD20;
- вызванный эффекторными клетками фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD20; или
- вызванная эффекторными клетками антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC, АЗКЦ)

клеток, экспрессирующих CD20.

Признанные в технике синонимы CD20 включают В-лимфоцитарный антиген CD20, антиген В1 на поверхности В-лимфоцитов, Leu-16, Вр35, ВМ5 и LF5.

Предполагается, что применяемое в данном описании выражение "ингибирует рост" (например, по отношению к клетке) включает любое измеряемое уменьшение роста клеток при контакте с антителом против CD20 по сравнению с ростом тех же самых клеток, не контактирующих с антителом против CD20, например ингибирование роста клеточной культуры по меньшей мере примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 69, 70, 80, 90, 99 или 100%. Такое уменьшение роста клеток может происходить по различным механизмам, например, таким как фагоцитоз эффекторными клетками, ADCC, CDC и/или апоптоз.

Термин "рафт", "плот" относится к обогащенным сфинголипидами и холестерином мембранным микродоменам, локализованным на внешней поверхности плазменной мембраны клетки. Способность некоторых белков ассоциироваться с такими доменами может влиять на функцию белка. Например, транслокация молекул CD20 в липидные рафты после связывания человеческими антителами по настоящему изобретению дает в плазменных мембранах комплексы антиген CD20-антитело высокой плотности. Такая высокая плотность комплексов CD20-антитело может способствовать эффективной активации системы комплемента в процессе CDC.

Термин "антитело" по данному описанию включает целые антитела и любой его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающий участок") или его одиночную цепь. "Антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, связанных дисульфидными связями, или его антигенсвязывающий фрагмент. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в данном описании V_H) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в данном описании V_L) и константной области легкой цепи. Области V_H и V_L можно далее подразделить на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающимися (с вкраплениями) более консервативными областями, называемыми остовными (каркасными, скелетными, FR) областями. Каждая V_H и V_L область состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антигенсвязывающий участок (область, фрагмент)" антитела (или просто "область (участок, фрагмент) антитела" по данному описанию относится к одному или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, CD20). Показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий участок" антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из V_H , V_L , C_L и C_{H1} доменов; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из V_H и C_{H1} доменов; (iv) фрагмент Fv, состоящий из V_H и V_L доменов единственного плеча молекулы антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из V_H домена; (vi) выделенную варибельную область (CDR) и (vii) комбинацию из двух или более изолированных CDR, которые, необязательно, могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, V_H и V_L , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с применением методов рекомбинантной ДНК с помощью синтетического линкера, который позволяет им находиться в виде единой белковой цепи, в которой V_H и V_L области спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426 и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Другим примером являются слитые белки связывающего домена иммуноглобулинов, содержащие (i) полипептид связывающего домена, который сливается с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) CH2 константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с полипептидом шарнирной области, и (iii) CH3 константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с CH2 константной областью. Полипептид связывающего домена может быть варибельной областью тяжелой цепи или варибельной областью легкой цепи. Такие химерные белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно описаны в патентных заявках США 2003/0118592 и 2003/0133939. Эти фрагменты антитела получены общепринятыми методами, известными специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на полезность таким же способом, как и интактные антитела.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных группирующихся на поверхности молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и, как правило, имеют специфические признаки трехмерной структуры, а также специфический заряд. Конформационные и неконформационные эпитопы

различаются тем, что связывание с первым, но не с последним, утрачиваются в присутствии денатурирующих агентов.

Термин "прерывистый эпитоп" по данному описанию означает конформационный эпитоп на белковом антигене, который образуется по меньшей мере из двух отдельных областей в первичной последовательности белка.

Предполагается, что термин "биспецифическая молекула" включает любой агент, например белок, пептид или комплекс белка или пептида, который имеет две различные специфичности связывания. Например, молекула может связываться с или взаимодействовать с (а) антигеном клеточной поверхности и (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки. Предполагается, что термин "полиспецифическая молекула" или "гетероспецифическая молекула" включает любой агент, например белок, пептид или комплекс белка или пептида, который имеет более двух различных специфичностей связывания. Например, молекула может связываться с или взаимодействовать с (а) антигеном клеточной поверхности, (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки и (с) по меньшей мере одним другим компонентом. Соответственно изобретение включает, но без ограничения, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и другие полиспецифические молекулы, которые направлены на антигены клеточной поверхности, такие как CD20, и на другие мишени, такие как Fc-рецепторы на эффекторных клетках.

Термин "биспецифическое антитело" также включает "diabodies" ("диатела"). "Диатела" ("diabodies") представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых V_H и V_L домены экспрессируются на одиночной полипептидной цепи, но, так как используется линкер, слишком короткий для того, чтобы было возможно спаривание двух доменов на одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта (см., например, Hollinger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Термин "производные человеческого антитела" относится к любой модифицированной форме антитела, например к конъюгату антитела и другому агенту или антителу.

Выражение "происходит из", "из", "образовано из" конкретной последовательности зародышевой линии применяется в данном описании, если антитело получают из системы, использующей последовательности человеческих иммуноглобулинов, например, иммунизацией трансгенной мыши, несущей гены человеческих иммуноглобулинов, или скринингом библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, причем аминокислотная последовательность выбранного человеческого антитела по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, человеческое антитело, образованное из конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, демонстрирует не более 10 различий аминокислот, более предпочтительно не более 5 или еще более предпочтительно не более 4, 3, 2 или 1 различия аминокислот от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Применяемый в данном описании термин "гетероантитела" относится к двум или более антителам, их производным или антигенсвязывающим областям, связанным вместе, из которых по меньшей мере два имеют различные специфичности. Эти различные специфичности включают специфичность связывания с Fc-рецептором на эффекторной клетке и специфичность связывания с антигеном или эпитопом на клетке-мишени, например опухолевой клетке.

Предполагается, что термин "человеческое антитело" по данному описанию включает антитела, имеющие переменные и константные области последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями геном человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" по данному описанию не предполагает включать антитела, в которых последовательности CDR из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, могут быть введены ("трансплантированы") в человеческие основные последовательности.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" по данному описанию относятся к препарату молекул антитела единого молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела демонстрирует единую (общую) специфичность и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Следовательно, термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, проявляющим единую (общую) специфичность, которые имеют переменные и константные области из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или "транскромосомного" отличного от человека животного, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" по данному описанию включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируются, создаются или выделяются методами рекомбинантной

ДНК, такие как (а) антитела, выделенные из животного (например, мышцы), трансгенного или "трансхромосомного" по генам человеческих иммуноглобулинов или полученных из них гибридом (описанных ниже в разделе 1), (б) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например из трансфектомы, (с) антитела, выделенные при использовании комбинаторной библиотеки, содержащей рекомбинантные человеческие антитела, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов в последовательности других ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела могут претерпевать *in vitro* мутагенез (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям человеческого Ig, *in vivo* соматический мутагенез), и тем самым аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантных антител секвенируют таким образом, что несмотря на то, что они образованы из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и являются родственными им, они не могут существовать в природе в составе человеческого антитела зародышевой линии *in vivo*.

Термин "трансфектома" по данному описанию включает рекомбинантную эукариотную клетку-хозяина, экспрессирующую антитело, такую как клетки CHO, клетки NS/0, клетки НЕК293, растительные клетки или клетки грибов, включая клетки дрожжей.

Применяемый в данном описании термин "гетерологическое антитело" определяют в связи с трансгенным, отличным от человеческого, организмом, продуцирующим такое антитело. Этот термин относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность или кодирующую нуклеотидную последовательность, соответствующие последовательностям антитела, обнаруживаемого в организме, не являющемся организмом трансгенного отличного от человека животного, и, как правило, вида, иного, нежели вид в трансгенном отличном от человека животном.

Применяемый в данном описании термин "гетерогрибридное антитело" относится к антителу, имеющему легкую и тяжелую цепи, происходящие из различных организмов. Например, антитело, имеющее тяжелую цепь, ассоциированную с мышшиной легкой цепью, является гетерогрибридным антителом. Примеры гетерогрибридных антител включают химерные и гуманизированные антитела, обсуждавшиеся выше.

Предполагается, что термин "выделенное антитело" по данному описанию относится к антителу, практически не содержащему других антител, имеющих отличные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD20, практически не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, иными, нежели CD20). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого CD20, может, однако, иметь кросс-реактивность в отношении других родственных антигенов, например других видов (например, гомологи CD20 вида). Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном варианте изобретения комбинация "выделенных" моноклональных антител, имеющих различные специфичности, объединены в определенную композицию.

Применяемый в данном описании термин "специфическое связывание" относится к антителу, связывающемуся с заданным антигеном. Как правило, антитело связывается с аффинностью, соответствующей K_D , примерно, 1×10^{-7} М или меньше, и связывается с заданным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая по меньшей мере на два порядка (по абсолютной величине) ниже, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), иным, нежели заданный антиген или близкородственный антиген. Выражения "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное в отношении антигена" применяются в данном описании взаимозаменяемо, поочередно с выражением "антитело, которое связывается специфически с антигеном".

Предполагается, что применяемое в данном описании выражение " k_d " (s^{-1}) относится к константе скорости диссоциации взаимодействия "конкретное антитело-антиген". Указанную величину также называют величиной k_{off} .

Предполагается, что применяемое в данном описании выражение " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$) относится к константе скорости ассоциации взаимодействия "конкретное антитело-антиген".

Предполагается, что применяемое в данном описании выражение " K_D " (М) относится к константе равновесной диссоциации взаимодействия "конкретное антитело-антиген".

Предполагается, что применяемое в данном описании выражение " K_A " (M^{-1}) относится к константе равновесной ассоциации взаимодействия "конкретное антитело-антиген" и эту величину получают делением k_a на k_d .

Предполагается, что применяемый в данном описании термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM или IgG1), которые кодируются генами константных областей тяжелой цепи.

Применяемое в данном описании выражение "переключение изотипа" относится к явлению, когда класс, или изотип, антитела меняется с одного Ig класса на один из других Ig классов.

Применяемое в данном описании выражение "непереключенный изотип" относится к изотипическому классу тяжелой цепи, которая продуцируется, когда не происходит переключения изотипа; СН ген, кодирующий непереключенный изотип, как правило, представляет собой первый ген непосредственно по ходу транскрипции от функционально реаранжированный VDJ ген. Переключение изотипа классифицируют как классическое или неклассическое переключение изотипа. Классическое переключение изотипа происходит с помощью событий рекомбинации, которые включают по меньшей мере одну область последовательности-переключателя в трансгене. Неклассическое переключение изотипа может происходить, например, гомологичной рекомбинацией между человеческой σ_{μ} и человеческой Σ_{μ} (δ -ассоциированная делеция). Альтернативные неклассические механизмы переключения, среди прочего, такие как интертрансгенная и/или интерхромосомная рекомбинация, могут происходить и осуществлять переключение изотипа.

Применяемый в данном описании термин "последовательность-переключатель" относится к последовательностям ДНК, ответственным за рекомбинацию с переключением. Последовательность "донора переключения", как правило, μ область переключения, располагается 5' (т.е. upstream, против хода транскрипции) от области конструкции, удаляемой в ходе рекомбинации с переключением. Область "акцептора переключения" находится между удаляемой (делетируемой) конструкцией и константной областью замены (например, γ , ϵ и т.д.). Так как отсутствует специфичный сайт, в котором всегда происходит рекомбинация, последовательность конечного гена, как правило, нельзя предсказать исходя из конструкции.

Применяемый в данном описании термин "тип гликозилирования, гликозилирующий паттерн" определяется как тип (паттерн) углеводовных единиц (элементов), ковалентно связанный с белком, более конкретно с иммуноглобулиновым белком (белком антитела). Тип гликозилирования гетерологического антитела можно охарактеризовать как практически аналогичный типам гликозилирования, встречающимся в природе на антителах, продуцированных видом отличным от человека трансгенного животного, когда специалист в данной области техники поймет, что тип гликозилирования гетерологического антитела более похож на тип гликозилирования вида отличным от человека животного, чем на вид, из которого образованы СН гены трансгена.

Термин "природный" по данному описанию, применяемый к объекту, относится к тем случаям, когда объект может встречаться в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которую можно выделить из источника в природе и которая не модифицирована преднамеренно человеком в лаборатории, является природной.

Термин "реаранжированный", "перегруппированный" по данному описанию относится к конфигурации тяжелой цепи или легкой цепи локуса иммуноглобулина, в котором V сегмент позиционирован как непосредственно прилегающий к D-J или J сегменту в конформации, кодирующей в основном полный V_H и V_L домен соответственно. Перегруппированный (реаранжированный) локус гена иммуноглобулина (антитела) можно идентифицировать, сравнивая с ДНК зародышевой линии; перегруппированный локус содержит по меньшей мере один рекомбинированный гептамерный/нонамерный элемент гомологии.

Термин "неаранжированный" ("неперегруппированный") или "конфигурация зародышевой линии" по данному описанию по отношению к V сегменту относится к конфигурации, в которой V сегмент не рекомбинируется таким образом, чтобы непосредственно прилегать к сегменту D или J.

Предполагается, что термин "нуклеотидная молекула", "молекула нуклеиновой кислоты" по данному описанию включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Нуклеотидная молекула может быть односторонней (одноцепочечной) или двухсторонней (двухцепочечной), но предпочтительно двухсторонней ДНК.

Предполагается, что термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" по данному описанию по отношению к нуклеиновым кислотам (нуклеотидам), кодирующим полные антитела или участки антител (например, V_H , V_L , CDR3), которые связываются с CD20, относится к нуклеотидной молекуле, в которой нуклеотидные последовательности, кодирующие интактное антитело или фрагмент антитела, не содержат других нуклеотидных последовательностей, кодирующих полное антитело или фрагменты (участки) антитела, которые связывают антигены, иные, нежели CD20, каковые другие последовательности могут в природе фланкировать нуклеиновую кислоту в человеческой геномной ДНК. В одном варианте изобретения человеческое антитело против CD20 включает нуклеотидную или аминокислотную последовательность 2F2, 7D8 или 11B8, а также переменные области тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L), имеющие последовательности, показанные на SEQ ID NO: 1, 5 или 9 и SEQ ID NO: 3, 7 или 11 соответственно.

Как описывается в данном описании и заявляется в формуле в данном описании, последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-30, включают "модификации консервативных последовательностей", т.е. модификации нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, которые не оказывают значительного влияния на или не изменяют в значительной степени характеристики связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность. Такие модификации консервативных последовательностей включают нуклеотидные и аминокислотные

кислотные замены, добавления или делеции. Модификации можно вводить в SEQ ID NO: 1-30 стандартными методами, известными в технике, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают замены, в которых аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, определены (охарактеризованы, установлены) в технике. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, остаток заменимой аминокислоты в человеческом антителе против CD-20 предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из семейства с такими же боковыми цепями.

Настоящее изобретение также охватывает "производные" аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 1-30, и модификации их консервативных последовательностей, в которых один или более аминокислотный остаток дериватизирован, например, ацилированием или гликозилированием, что не оказывает значительного влияния или не изменяет значительно характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотные последовательности.

Кроме того, настоящее изобретение включает антитела, в которых сделаны изменения в Fc области, чтобы изменить функциональные или фармакокинетические свойства антител. Такие изменения могут привести к уменьшению или увеличению C1q связывания и CDC или FcγR связывания и ADCC. Можно, например, сделать замены в одном или более аминокислотных остатков в положениях 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 константной области тяжелой цепи, тем самым вызывая изменение эффекторной функции, в то же время сохраняя способность связываться с антигеном, по сравнению с немодифицированным антителом, ср. патенты США 5624821 и 5648260.

In vivo период полужизни антител можно также увеличить, модифицируя эпитоп рецептора "мусорщика" константного домена Ig или Ig-подобного константного домена так, чтобы молекула не содержала интактного CH2 домена или интактной Ig Fc области, ср. патенты США 6121022 и 6194551. Кроме того, in vivo период полужизни можно увеличить, осуществляя мутации в Fc области, например, заменой треонина на лейцин в положении 252, заменой треонина на серин в положении 254 или заменой треонина на фенилаланин в положении 256, ср. патент США 6277375.

Помимо этого, тип гликозилирования антител можно модифицировать для того, чтобы изменить эффекторную функцию антител. Например, можно экспрессировать антитела в трансфектоте, которая не добавляет элемент (единицу) фукозы, обычно соединенный с Asn в положении 297 области Fc, чтобы повысить аффинность области Fc к FcγRIII, что, в свою очередь, приведет к повышенной АЗКЦ (ADCC) антител в присутствии клеток NK, ср. Shield et al. (2002), JBC, 277:26733. Кроме того, для модификации CDC можно модифицировать галактозилирование.

Или же, в другом варианте изобретения можно вводить мутации произвольно по всей или по участку последовательности, кодирующей антитело против CD-20, например, с помощью мутагенеза насыщения, и полученные в результате модифицированные антитела против CD-20 можно подвергнуть скринингу на активность связывания.

Соответственно антитела, кодированные (вариабельные области тяжелой и легкой цепи) нуклеотидными последовательностями по данному описанию и/или содержащие (вариабельные области тяжелой и легкой цепи) аминокислотные последовательности по данному описанию (т.е. SEQ ID NO: 1-30), включают практически аналогичные антитела, кодированные аналогичными последовательностями или содержащие аналогичные последовательности, "консервативно модифицированные". Дополнительное обсуждение того, как эти практически аналогичные антитела можно получить исходя из частичных (например, вариабельных областей тяжелой и легкой цепи) последовательностей по данному описанию, таких как SEQ ID NO: 1-30, дано ниже.

В случае нуклеиновых кислот термин "практическая гомология" указывает, что две нуклеиновые кислоты или их указанные последовательности при оптимальном наложении и сравнении являются идентичными при наличии соответствующих инсерций или делеций нуклеотидов по меньшей мере примерно в 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере примерно в 90-95% нуклеотидов и более предпочтительно по меньшей мере примерно в 98-99.5% нуклеотидов. Или же, практическая гомология существует, когда сегменты гибридизуются в селективных условиях гибридизации с комплементом цепи.

По отношению к нуклеотидной и аминокислотной последовательностям термин "гомология" указывает на степень идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями при оптимальном наложении и сравнении с соответствующими инсерциями или делециями. Или же, практическая гомология существует тогда, когда ДНК сегменты гибридизуются в селективных условиях гибридизации с комплементом цепи.

Процент идентичности двух последовательностей является функцией числа идентичных положений, общих для последовательностей (например, % гомологии= $\frac{\text{число идентичных положений}}{\text{общее число положений}} \times 100$), принимается во внимание число гэпов и протяженность каждого гэпа, которые требуется ввести для оптимального совмещения (наложения) двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно выполнять, используя математический алгоритм, описанный в неограничивающих примерах, приведенных ниже.

Процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей можно определить, используя GAP программу в программном обеспечении GCG (доступной по адресу в Интернете <http://www.gcg.com>), используя матрицу NWSgapdna.CMP и массу гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 "length weight" 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей можно также определить с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (вариант 2.0), используя PAM120 таблицу масс остатков, штрафную функцию длины гэпа 12 и штрафную функцию гэпа 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который встроен в программу GAP в программном обеспечении GCG (доступной по адресу в Интернете <http://www.gcg.com>), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250 и массу гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и "length weight" 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Далее, нуклеотидные и аминокислотные последовательности по данному изобретению можно использовать в качестве "последовательности по запросу" для осуществления поиска в доступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такой поиск можно осуществлять, например, используя программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, показатель (степень)=100, длина кода=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот по изобретению. Поиск BLAST белков можно осуществлять с помощью программы XBLAST, степень=50, длина кода=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по изобретению. Для проведения совмещения последовательностей с гэпами с целью сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, описанную Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) по умолчанию; см. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "представленной практически чистой", когда она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, включая обработку щелочью/SDS, CsCl бэндинг (дифференциальное окрашивание хромосом), колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие общеизвестные в технике методы; см. F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley biterscience, New York (1987).

Составы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, хотя часто имеющие нативную последовательность (за исключением модифицированных сайтов рестрикции и т.п.) любой кДНК, геномной или их смесей, можно сделать мутантными стандартными методами с целью получения последовательностей генов. В случае кодирующих последовательностей эти мутации, если нужно, могут влиять на аминокислотную последовательность. В частности, рассматриваются последовательности ДНК, практически гомологичные нативным V, D, J, константным переключениям и другим таким последовательностям по данному описанию или образованные из этих последовательностей (где "образованный" ("derived") указывает на то, что последовательность идентична другой последовательности или получена модификацией другой последовательности).

Нуклеиновая кислота "функционально связана", если она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Что касается транскрипции регуляторных последовательностей, функционально связанный означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются соседними и, если необходимо соединить две области, кодирующие белок, соседними и в рамке считывания. Что касается последовательностей-переключателей, "функционально связанный" указывает, что последовательности способны осуществлять рекомбинацию переключения.

Предполагается, что термин "вектор" по данному описанию относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать (переносить) другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является "плазмида", термин, относящийся к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные ДНК сегменты. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные ДНК сегменты могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный ориджин репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегри-

рованы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и тем самым реплицированы вместе с геномом-хозяином. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном описании называются "векторами рекомбинантной экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). В целом векторы экспрессии, применяемые в методах рекомбинантной ДНК, часто находятся в виде плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут применяться взаимозаменяемо, так как плазида является наиболее общепотребительной формой вектора. Предполагается, однако, что изобретение включает такие другие формы векторов экспрессии (экспрессирующих векторов), как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют аналогичные (эквивалентные) функции.

Предполагается, что термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") по данному описанию относится к клетке, в которую вводят рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины, как предполагается, относятся не только к клетке конкретного субъекта, но к потомству такой клетки. Так как в последующих поколениях могут встречаться некоторые модификации вследствие либо мутации, либо влияния окружающей среды, на самом деле такое потомство может не быть идентичным родительской клетке, но, тем не менее, охватывается термином "клетка-хозяин" по данному изобретению. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки NS/0 и лимфоциты.

Термин "субъект" по данному описанию включает человека или отличное от человека животное. Термин "отличное от человека ("нечеловеческое") животное" включает всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овца, собака, корова, куры, земноводные, пресмыкающиеся и т.д.

Выражение "трансгенное отличное от человека животное" относится к отличному от человека животному, имеющему геном, содержащий один или более трансгенов или трансхромосом с тяжелой и/или легкой цепью человеческого происхождения (интегрированных или неинтегрированных в природную геномную ДНК животного) и способный экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может иметь трансген с легкой цепью человеческого происхождения и либо трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения, либо трансхромосому с тяжелой цепью человеческого происхождения, так что мышь, будучи иммунизирована CD20 антигеном и/или клетками, экспрессирующими CD20, продуцирует человеческие антитела против CD20. Трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения можно интегрировать в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных, например, HuMAb мышей, таких как мыши Hco7 или Hco12, или трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения можно сохранять вне хромосомы, как в случае трансхромосомных (например, KM) мышей, описанных в Международной заявке WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши способны продуцировать многие изоформы человеческих моноклональных антител к CD20 (например, IgG, IgA и/или IgE), если претерпевают V-D-V рекомбинацию и переключение изоформы.

Различные аспекты изобретения более подробно описаны в подразделах, приведенных ниже.

I. Получение человеческих антител к CD20.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению можно получать многими методами, включая обычную методологию моноклональных антител, например стандартный метод гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975). Хотя методы гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе для получения моноклонального антитела можно применять другие методы, например вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов или методы фагового дисплея, используя библиотеки генов человеческих антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, является мышьяная система.

Получение гибридом в мышья является общепризнанным методом. Протоколы иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния (гибридизации) известны в технике. Гибридообразующие клетки-партнеры, например клетки мышьяной миеломы, и методики гибридизации также известны.

В предпочтительном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела против CD20 можно получать, используя трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих фрагменты (части) скорее иммунной системы человека, нежели системы мышья. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, обозначенных в данном описании "мышья HuMAb" и "мышья KM" соответственно, и в данном описании имеют общее название "трансгенные мышья".

Мышь HuMAb содержит "минокусы" гена человеческого иммуноглобулина, которые кодируют неперегруппированные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой (κ) цепи человеческого иммуноглобулина, вместе с нацеленными мутациями, которые инактивируют локусы эндогенных μ - и κ -цепей (Lonberg, N. et al (1994) Nature 368 (6474): 856-859). Соответственно мышья проявляют пониженную экспрессию мышьяного IgM или κ и в ответ на иммунизацию, введенные трансгены с тяжелой и легкой цепью человеческого происхождения претерпевают переключение класса и соматическую мутацию с обра-

зованием человеческих моноклональных антител IgG_κ (Lonberg, N. et al. (1994), см. выше; обзор в Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaille et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920, Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. Помимо этого, см. патенты США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; все выданы Lonberg and Kay, а также патент США 5545807, выданный Surani et al.; международные заявки WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 b WO 01/09187.

Мышь KM содержит трансхромосому с тяжелой цепью человеческого происхождения и с легкой цепью человеческого происхождения трансгена. Эндогенные гены с мышью тяжелой и легкой цепью также диссоциированы в мышах KM, так что иммунизация мышей ведет скорее к продуцированию человеческих иммуноглобулинов, нежели мышинных иммуноглобулинов. Конструкция KM мышей и их применение для индуцирования человеческих иммуноглобулинов подробно описаны в Международной заявке WO 02/43478.

Иммунизация.

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к CD20 трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены человеческих иммуноглобулинов (например, мышей HCo12, HCo7 или KM), можно иммунизировать препаратом, обогащенным CD20 антигеном, и/или клетками, экспрессирующими CD20, описанными, например, в Lonberg et al. (1994), см. выше; Fishwild et al (1996), см. выше, и в Международной патентной заявке WO 98/24884. Или же, мышью можно иммунизировать ДНК, кодирующими человеческий CD20. Предпочтительно для первой инфузии берут мышью в возрасте 6-16 недель. Например, обогащенный препарат (5-50 мкг) антигена CD20 можно использовать для иммунизации мышей HuMAb интраперитонеально. В события, когда иммунизация с использованием очищенного и обогащенного антигена CD20 не приводит к антителам, для индуцирования иммунного ответа мышью можно также иммунизировать клетками, экспрессирующими CD20, например клеточной линией.

Кумулятивный опыт с различными антигенами показал, что трансгенные мыши HuMAb лучше всего отвечают (реагируют), когда их сначала иммунизируют интраперитонеально (IP) или подкожно (SC) клетками, экспрессирующими CD20, в полном адьюванте Фрейнда с последующими IP иммунизациями через неделю (каждые две недели) (всего вплоть до 10) клетками, экспрессирующими CD20, в PBS. Мониторинг иммунного ответа можно проводить в течение курса иммунизации по протоколу с образцами плазмы, полученными при ретроорбитальном кровотоке. Скрининг плазмы можно проводить с помощью анализа FACS (описанного ниже), а мышью с удовлетворительными титрами человеческого иммуноглобулина против CD20 можно использовать для слияний (гибридизации). Мышам можно внутривенно вводить бустер-инъекцию клеток, экспрессирующих CD20, за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки.

Получение гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела против CD20.

Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела к человеческому CD20, спленоциты и клетки лимфатических узлов иммунизированных мышью можно выделить и гибридизовать с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия мышью миеломы. Полученные гибридомы можно затем подвергнуть скринингу на продуцирование антиген-специфических антител. Например, единую суспензию лимфоцитов селезенки иммунизированных мышью можно гибридизовать с SP2/O Ag8.653 несекретирующими клетками мышью миеломы (ATCC, CRL 1580) с 50% PEG (вес./об.). Клетки можно засеивать с примерной плотностью 1×10^6 на лунку в титрационный микропланшет с плоским профилем дна лунки с последующей двухнедельной инкубацией в селективной среде, содержащей, помимо обычных реагентов, 10% фетальной (телячьей) сыворотки для клонирования, 5-10% фактора начала клонирования гибридомы (IGEN) и 1X HAT (Sigma). Примерно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT замещают на HT. Затем индивидуальные клетки можно подвергнуть скринингу методом ELISA на антитела, содержащие легкую цепь к человеческого происхождения, и анализом FACS с применением клеток, экспрессирующих CD20, на CD20 специфичность. Обычно, когда происходит интенсивный рост гибридом, среду можно наблюдать через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитела, можно снова культивировать, снова подвергнуть скринингу и, если они позитивны в отношении человеческого IgG, моноклональные антитела против CD20 можно субклонировать по меньшей мере дважды при ограниченном разведении. Стабильные субклоны можно затем культивировать *in vitro* для получения антитела в тканевой культуральной среде для характеристики.

Получение трансфектом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела с CD20.

Человеческие антитела по изобретению также можно получать в трансфектоне клетки-хозяина, используя, например, комбинацию методов рекомбинантной ДНК и методов трансфекции гена, хорошо известных в технике (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Например, в одном варианте изобретения ген(-ы), представляющий(-ие) интерес, например ген человеческих антител, может быть лигирован в экспрессирующий вектор, такой как плазмида экспрессии в клетках эукариот, такую, как используемая системой экспрессии GS генов, описанной в Международных заявках WO 87/04462, WO 89/01036 и Европейском патенте EP 338841, или другими системами экспрессии, хорошо известными в технике. Очищенную плазмиду с генами клонированных антител можно вводить в эукариотные клетки-хозяева, такие как клетки CHO, клетки NS/0 или клетки HEK293, или же другие эукариотные клетки, такие как растительные клетки, клетки грибов или дрожжей. Способ, используемый для введения этих генов, может быть методом, описанным в технике, таким как электропорация, липофектин, липофектамин или другие методы. После введения этих генов антител в клетки-хозяева клетки, экспрессирующие антитело, могут быть идентифицированы и селектированы. Эти клетки представляют собой трансфектомы, которые можно амплифицировать до их уровня экспрессии и сделать способными продуцировать антитела. Рекомбинантные антитела можно выделить и очистить от этих культуральных супернатантов и/или клеток.

Дополнительные рекомбинантные методы продуцирования человеческих моноклональных антител к CD20.

Или же, гены клонированных антител можно экспрессировать в других системах экспрессии, включая клетки прокариот, такие как клетки микроорганизмов, таких как *E. coli*, для получения одноцепочечных Fv антител, водоросли и клетки насекомых. Помимо этого, антитела могут продуцироваться в трансгенных животных, отличных от человека, например в молоке овец и кроликов или в яйцах кур, или в трансгенных растениях; см., например, Verma, B. et al. (1998). *Antibody engineering: Comparison bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems*. *J. Immunol. Meth.* 216:165-181; Pollock, et al (1999). *Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies*. *J. Immunol. Meth.* 231:147-157 и Fischer, B., et al. (1999). *Molecular farming of recombinant antibodies in plants*. *Biol. Chem.* 380:825-839.

Применение частичных последовательностей антител для экспрессии интактных антител.

Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно за счет аминокислотных остатков, которые расположены на шести гипервариабельных участках (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR являются более разнообразными в индивидуальных антителах, нежели последовательности вне CDR.

Так как последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антиген-антитело, возможно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые подражают свойствам специфичных природных антител, за счет конструкции экспрессирующих векторов, включающих последовательности CDR специфичного природного антитела, "пересаженные" в остовные последовательности из отличного (другого) антитела с отличными (другими) свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525 и Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033). Такие остовные последовательности можно получить из доступных баз данных ДНК, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Эти последовательности генов антител зародышевой линии отличаются от последовательностей зрелых генов, кодирующих антитела, так как они не включают полностью собранных вариабельных генов, которые образуются соединением V(D)J в процессе созревания В-клетки. Последовательности гена зародышевой линии также будут отличаться от последовательностей вторичного антитела спектра с высокой аффинностью у индивидуума одинаково по всей вариабельной области. Например, соматические мутации являются относительно нечастыми на аминоконцевой части остовой области 1 и на карбоксиконцевой части остовой области 4. Кроме того, многие соматические мутации незначительно изменяют свойства связывания антитела. По этой причине нет необходимости получать полную последовательность ДНК, кодирующей конкретное антитело, чтобы воссоздать интактное рекомбинантное антитело, обладающее свойствами связывания, аналогичными свойствам связывания оригинального (первоначального) антитела (см. WO 99/45962). Как правило, для этой цели достаточно частичной последовательности тяжелой и легкой цепи, охватывающей CDR области. Частичную последовательность используют для определения, какие вариабельные и соединительные генные сегменты зародышевой линии вносят вклад в вариабельные гены рекомбинированного антитела. Последовательность зародышевой линии используют затем для заполнения недостающих частей вариабельных доменов. Лидерные последовательности тяжелой и легкой цепей отщепляются в процессе созревания белка и не вносят вклад в свойства конечного антитела. Для добавления недостающих последовательностей клонированные последовательности кДНК можно соединять с синтетическими олигонуклеотидами лигированием или ПЦР-амплификацией. Или же, полные вариабельные домены можно синтезировать в виде набора коротких, перекрывающихся олигонуклеотидов и объединять с помощью ПЦР-амплификации, чтобы создать клон полностью синтетической вариабельной области. Этот процесс имеет определенные преимущества, такие как элиминирование или включение конкретных сайтов рестрикции или оптимизация конкретных кодонов.

Нуклеотидные последовательности и транскрипты легких цепей из гибридом используют для дизайна перекрывающегося набора синтетических олигонуклеотидов при создании синтетических V последовательностей со способностью кодировать аминокислоты, идентичной природным последовательностям. Синтетические последовательности тяжелой и κ-цепей могут отличаться от природных последовательностей по трем направлениям: ряды повторяющихся нуклеотидных оснований прерываются, чтобы упростить синтез олигонуклеотидов и ПЦР-амплификацию; сайты инициации оптимальной трансляции вводятся согласно правилам Козака (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870) и сайты HindIII создаются в 3'-5' (upstream) направлении от сайтов инициации трансляции.

Для переменных областей как тяжелой, так и легкой цепей оптимизированные кодирующие и соответствующие некодирующие последовательности цепей разбиваются на 30-50 нуклеотидов примерно посередине (в средней точке) некодирующего олигонуклеотида. Таким образом, для каждой цепи олигонуклеотиды можно собрать в перекрывающиеся двухцепочечные наборы, которые охватывают сегменты из 150-400 олигонуклеотидов. Затем пулы используют в качестве матриц для получения продуктов ПЦР-амплификации из 150-400 олигонуклеотидов. Как правило, единый набор олигонуклеотидов переменной области можно разбить на два пула, которые амплифицируют отдельно, чтобы получить два перекрывающихся ПЦР-продукта. Затем эти перекрывающиеся продукты соединяют ПЦР-амплификацией с образованием полной переменной области. Также может быть желательным ввести перекрывающийся фрагмент константной области тяжелой или легкой цепи (включающий сайт BbsI легкой цепи κ или сайт AgeI тяжелой цепи γ) в ПЦР-амплификацию, чтобы получить фрагменты, которые можно легко клонировать в экспрессирующие векторные конструкции.

Реконструированные переменные области тяжелой и легкой цепей затем соединяют с клонированными промотором, лидерной последовательностью, последовательностями сайта инициации трансляции, константной области, 3' нетранслируемой области, сайта полиаденилирования и сайта терминации транскрипции с образованием экспрессирующих векторных конструкций. Конструкции экспрессии тяжелой и легкой цепей можно объединить в единый вектор, котрансфецировать, последовательно трансфецировать или по отдельности трансфецировать в клетки-хозяева, а затем слить (гибридизовать) с образованием клетки-хозяина, экспрессирующей обе цепи.

Плазмиды для применения в конструкции экспрессирующего вектора для человеческого IgG, κ описаны ниже. Плазмиды конструированы таким образом, чтобы ПЦР-амплифицированные последовательности κДНК V тяжелой и V κ легкой цепей можно было использовать для реконструкции минигенов полной тяжелой и легкой цепей. Эти плазмиды можно использовать для экспрессии полностью человеческих или химерных IgG1,κ или IgG4,κ антител. Аналогичные плазмиды можно конструировать для экспрессии других изотипов легкой цепи или для экспрессии антител, содержащих легкие цепи λ.

Так, в другом аспекте изобретения структурные особенности (признаки) человеческих антител против CD20 по изобретению, например 11B8, 2F2 или 7D8, используются для создания родственных по структуре человеческих антител против CD20, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител по изобретению, такое как связывание с CD20. Более конкретно, одну или более CDR областей 2F2, 7D8 или 11B8 можно объединять рекомбинантно с известными остовными областями человеческого происхождения и CDR для создания дополнительных полученных методом рекомбинантной ДНК антител против CD20 по изобретению.

Соответственно в другом варианте изобретение включает способ получения антитела против CD20, заключающийся в получении антитела, содержащего (1) остовные области тяжелой цепи человеческого происхождения и CDR тяжелой цепи человеческого происхождения, в которых по меньшей мере одна из CDR тяжелой цепи человеческого происхождения содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей CDR, показанных на фиг. 53, 55 или 57 (или соответствующие аминокислотные остатки в SEQ ID NO: 13-15, 19-21 или 25-27); и (2) остовные области легкой цепи человеческого происхождения и CDR легкой цепи человеческого происхождения, в которых по меньшей мере одна из CDR легкой цепи человеческого происхождения содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей CDR, показанных на фиг. 53, 55 или 57 (или соответствующие аминокислотные остатки в SEQ ID NO. 16-18, 22-24 или 28-30); где антитело сохраняет способность связываться с CD20.

Способность антитела связываться с CD20 можно определить с применением стандартных анализов связывания, таких, которые представлены в примерах (например, FACS анализ).

Так как в технике хорошо известно, что домены CDR3 тяжелой и легкой цепей играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с антигеном, рекомбинантные антитела по изобретению, полученные, как представлено выше, предпочтительно содержат области CDR3 тяжелой и легкой цепей 2F2, 7D8 или 11B8. Антитела далее могут содержать области CDR2 2F2, 7D8 или 11B8. Кроме того, антитела могут содержать области CDR1 2F2, 7D8 или 11B8. Соответственно изобретение далее содержит антитела против CD20: (1) остовные области тяжелой цепи человеческого происхождения и область CDR1 тяжелой цепи человеческого происхождения, область CDR2 тяжелой цепи человеческого происхождения и область CDR3 тяжелой цепи человеческого происхождения, в которых

область CDR3 тяжелой цепи человеческого происхождения представляет собой CDR3 2F2, 7D8 или 11B8, показанные на фиг. 53, 55 или 57 (или соответствующие аминокислотные остатки в SEQ ID NO: 15, 21 или 27); и (2) остовные области легкой цепи человеческого происхождения и область CDR1 легкой цепи человеческого происхождения, область CDR2 легкой цепи человеческого происхождения и область CDR3 легкой цепи человеческого происхождения, в которых область CDR3 легкой цепи человеческого происхождения представляет собой CDR3 2F2, 7D8 или 11B8, показанные на фиг. 53, 55 или 57 (или соответствующие аминокислотные остатки в SEQ ID NO. 18, 24 или 30); где антитело связывается с CD20. Антитело может дополнительно содержать CDR2 тяжелой и/или легкой цепи 2F2, 7D8 или 11B8. Кроме того, антитела могут содержать области CDR1 тяжелой и/или легкой цепи 2F2, 7D8 или 11B8.

Предпочтительно CDR1, 2 и 3 антигенов, полученных методом рекомбинантной ДНК, описанные выше, содержат точно такую(-е) же аминокислоту(-ы), которые содержат 2F2, 7D8 или 11B8 по данному описанию. Однако рядовой специалист в данной области понимает, что возможно некоторое отклонение от точных CDR последовательностей 2F2, 7D8 или 11B8 при все еще сохраняющейся способности антигена эффективно связывать CD20 (например, консервативные замены). Соответственно в другом варианте изобретения антитело, полученное методом рекомбинантной ДНК, может состоять из одной или более областей CDR, которая, например, на 90, 95, 98 или 99.5% идентична одной или более областей CDR 2F2, 7D8 или 11B8.

Помимо простого связывания CD20 антитела, полученные методом рекомбинантной ДНК, такие как описанные выше, можно выбирать из-за сохранения ими других функциональных свойств антигенов по изобретению, таких как:

- (1) низкая скорость диссоциации ассоциата с CD20;
- (2) высокая аффинность связывания с CD20;
- (3) связывание с уникальным эпитопом на CD20;
- (4) опосредование высокого уровня CDC либо на CD55/59 негативных, либо на CD55/59 позитивных клетках;
- (5) транслокация в липидные рафты ("липидные плоты") при связывании с CD20;
- (6) ингибирование роста клеток, экспрессирующих CD20;
- (7) индуцирование (стимуляция) апоптоза клеток, экспрессирующих CD20;
- (8) индуцирование гомотипической адгезии клеток, экспрессирующих CD20;
- (9) пролонгированное выживание субъекта, имеющего опухолевые клетки, экспрессирующие CD20;
- (10) опосредование ADCC CD20 мишеней при смешении с соответствующими эффекторными клетками;
- (11) способность истощать клетки, экспрессирующие CD20; и/или
- (12) способность истощать клетки, экспрессирующие низкие уровни CD20 (CD20^{low} клетки).

Характеристика связывания моноклональных антител с CD20.

Для очистки человеческих антител против CD20 выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых колбах-центрифугах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно отфильтровать и упарить перед аффинной хроматографией с протеин А-сефарозой (для антител изотипа IgG1) (Pharmacia, Piscataway, NJ) или с сефарозой, покрытой антителом против человеческого IgG, или G-сефарозой в случае антител изотипа IgG3. Для гарантии чистоты элюированный IgG можно проверять с помощью гель-электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Буферный раствор можно заменить на PBS и концентрацию можно определять по OD₂₈₀, используя коэффициент 1.43. Моноклональные антитела можно аликвотировать и хранить при -80°C.

Для того чтобы определить, связываются ли человеческие моноклональные антитела против CD20 с уникальными эпитопами, можно использовать сайт-направленный или полисайт-направленный мутагенез.

Для определения изотипа очищенных антител можно осуществлять изотипический ELISA. Лунки микротитрационных планшетов можно покрывать пленкой из 10 мкг/мл антитела против человеческого Ig в течение ночи при 4°C. После блокирования с помощью 5% BSA в лунки планшетов добавляют 10 мкг/мл моноклональных антител или контрольных очищенных изотипов при комнатной температуре на 2 ч. Затем содержимое лунок может реагировать либо с человеческими IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, либо с зондами конъюгированной человеческой IgM-специфической щелочной фосфатазы. После промывания планшеты обрабатывают субстратом pNPP (1 мг/мл) и анализируют при OD 405-650.

Чтобы продемонстрировать присутствие антител против CD20 в сыворотках иммунизированных мышей или связывание моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими CD20, можно применять проточную цитометрию. Коротко говоря, клеточные линии, экспрессирующие CD20 (выращенные в стандартных условиях культивирования), смешивают с моноклональными антителами в различных концентрациях в PBS, содержащем 0.1 BSA и 0.02% азида натрия, и инкубируют при 4°C в течение 30 мин. После отмывания клетки реагируют с меченым флуоресцеином антителом против человеческого IgG в тех же условиях, что и первичное окрашивание антитела. Образцы можно анализировать проточной цитометрией на приборе FACS, используя светорассеяние и боковое рассеяние на одиночных живущих клетках. Альтернативный анализ с применением флуоресцентной микроскопии можно исполь-

зовать как дополнение к или вместо проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и исследовать методом флуоресцентной микроскопии. Этот метод делает возможной визуализацию отдельных клеток, но может иметь пониженную чувствительность, зависящую от плотности антигена.

Человеческие IgG против CD20 можно дополнительно тестировать на реактивность в отношении CD20 вестерн-блоттингом. Коротко говоря, можно приготовить клеточные экстракты клеток, экспрессирующих CD20, и подвергнуть их электрофорезу на додецилсульфат (SDS)-полиакриламидном геле. После электрофореза разделенные антигены можно перенести на нитроцеллюлозные мембраны, заблокировать 20% мышиной сывороткой и гибридизовать с зондом испытуемых моноклональных антител. Связывание человеческого IgG можно обнаружить, применяя конъюгат щелочной фосфатазы против IgG и обрабатывая таблетками субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Фагоцитарная активность человеческих моноклональных антител к CD20 и их активность в отношении киллинга клеток.

Помимо специфического связывания с CD20, человеческие моноклональные антитела против CD20 можно тестировать на их способность опосредовать фагоцитоз и киллинг клеток, экспрессирующих CD20. Тестирование активности моноклонального антитела *in vitro* обеспечит начальный скрининг перед тестированием *in vivo* моделей. Коротко говоря, полиморфноядерные клетки (PMN), NK клетки, моноциты или другие эффекторные клетки здоровых доноров можно очистить центрифугированием по плотности в среде Ficoll Нугауе с последующим лизисом примеси эритроцитов. Отмытые PMN можно суспендировать в среде RPMI, дополненной 10% термоинактивированной фетальной телячьей сывороткой, и смешать с мечеными ⁵¹Cr клетками, экспрессирующими CD20, при различных соотношениях эффекторных клеток к опухолевым клеткам (-эффекторные клетки: опухолевые клетки). Затем можно добавлять очищенные IgG против CD20 в различных концентрациях. В качестве негативного контроля можно использовать нерелевантные человеческие IgG. Анализ можно проводить в течение 4-20 ч при 37°C в зависимости от типа используемых эффекторных клеток. Образцы можно анализировать на цитолиз, измеряя выделение ⁵¹Cr в культуральный супернатант. Моноклональные антитела против CD20 можно также тестировать в комбинации друг с другом для определения, повышается ли цитолиз в присутствии нескольких моноклональных антител.

Человеческие моноклональные антитела, которые связываются с CD20, также можно испытывать на *in vivo* моделях (например, на мышях) для определения их эффективности в регулировании роста опухолевых клеток, экспрессирующих CD20. Эти антитела можно выбирать, например, на основе нижеприведенных критериев, которые не претендуют на эксклюзивность:

- 1) связывание с живыми клетками, экспрессирующими CD20;
- 2) низкая скорость диссоциации ассоциата с CD20;
- 3) высокая аффинность связывания с CD20;
- 4) связывание с уникальным эпителиом на CD20, и/или связывание в специфической ориентации с CD20, и/или связывание со специфической формой CD20;
- 5) опсонизация клеток, экспрессирующих CD20;
- 6) опосредование ингибирования клеток, фагоцитоза и/или киллинга клеток, экспрессирующих CD20, в присутствии человеческих эффекторных клеток;
- 7) способность индуцировать CDC либо на CD55/59 негативных, либо на CD55/59 позитивных клетках;
- 8) способность индуцировать гомотопическую адгезию;
- 9) способность индуцировать транслокацию в липидные рафты ("липидные плоты") при связывании с CD20;
- 10) способность индуцировать (стимулировать) апоптоз;
- 11) способность индуцировать ADCC на клетках, экспрессирующих CD20;
- 12) способность истощать клетки, экспрессирующие CD20; и/или
- 13) способность истощать клетки, экспрессирующие низкие уровни CD20 (CD20^{low} клетки).

Предпочтительные человеческие моноклональные антитела по изобретению отвечают одному или более этих критериев.

Человеческие моноклональные антитела против CD20 можно тестировать на их способность опосредовать CDC различными известными методами. Например, сыворотку для комплемента можно получать из крови здоровых субъектов, ее можно центрифугировать и собирать. Для определения CDC активности различных mAb можно использовать различные методы. Например, можно определять высвобождение ⁵¹Cr или можно оценивать повышенную проницаемость мембран методом исключения окрашиванием йодидом пропидия (PI). Коротко говоря, клетки-мишени можно отмывать и снова суспендировать в RPMI-1% BSA при плотности 1×10⁶/мл. К клеткам можно добавлять различные концентрации mAb и их оставляют связываться на 10-15 мин при комнатной температуре. Затем можно добавить сыворотку до конечной концентрации 20 об.% и клетки инкубируют при 37°C в течение 45 мин. Все клетки каждого образца можно прибавить к раствору PI в пробирке с FACS. Затем смесь можно сразу же оценивать проточной цитометрией на проточном цитометре FACScalibur и анализировать с помощью про-

граммы CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA).

Для испытания способности инициировать апоптоз человеческие моноклональные антитела против CD20 можно, например, инкубировать с CD20 позитивными опухолевыми клетками, например Daudi, при 37°C примерно в течение 20 ч. Клетки можно собрать, отмыть Annexin-V-FITC буфером для связывания (BD biosciences) и пометить с помощью Annexin-V-FITC (BD biosciences) в течение 15 мин в темноте при 4°C. Все клетки каждого образца можно прибавить к раствору PI (10 мкг/мл в PBS) в пробирке с FACS и сразу же оценивать проточной цитометрией (как указано выше).

В конкретном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела используются в комбинации, например, в виде фармацевтической композиции, содержащей два или более моноклональных антител против CD20. Например, человеческие моноклональные антитела, имеющие различные, но комплементарные активности, можно объединять в единое лекарственное средство для достижения заданного терапевтического или диагностического эффекта. В предпочтительном варианте композиция включает человеческое моноклональное антитело против CD20, которое опосредует CDC, объединенное с другим человеческим моноклональным антителом, которое стимулирует апоптоз. В другом варианте изобретения композиция включает человеческое моноклональное антитело против CD20, которое опосредует высокоэффективный киллинг клеток-мишеней в присутствии эффекторных клеток, объединенное с другим человеческим моноклональным антителом против CD20, которое ингибирует рост клеток, экспрессирующих CD.

II. Получение трансгенных отличных от человека животных, которые генерируют человеческие моноклональные антитела против CD20.

Еще в одном аспекте изобретение включает трансгенных или трансхромосомных отличных от человека животных, таких как трансгенные или трансхромосомные мыши, которые способны экспрессировать человеческие антитела, специфично связывающиеся с CD20. В особом варианте изобретение включает трансгенную или трансхромосомную мышь, имеющую геном, содержащий трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения, так, что при иммунизации клетками, экспрессирующими CD20, мышь продуцирует человеческие моноклональные антитела против CD20. Трансген с тяжелой цепью человеческого происхождения можно интегрировать в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных, например NuMAb, мышей, как подробно описано и показано на примерах в данном описании. Или же, трансген тяжелой цепи человеческого происхождения можно сохранять вне хромосомы, как в случае трансхромосомных мышей (например, KM), описанных в Международной заявке WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные животные способны продуцировать многие изоформы человеческих моноклональных антител против CD20 (например, IgG, IgA и/или IgF), претерпевая V-D-V/V-J рекомбинацию и переключение изоформы. Дизайн трансгенного или трансхромосомного отличного от человека животного, которое отвечает на стимуляцию чужеродным антигеном с помощью спектра гетерологических антител, требует, чтобы трансгены гетерологических иммуноглобулинов в организме трансгенного животного корректно функционировали на всем пути развития В-клетки. Это включает, например, переключение изоформы гетерологического трансгена тяжелой цепи. Соответственно трансгены строят таким образом, чтобы можно было индуцировать переключение изоформы и один или более следующих признаков генов антитела: (1) высокий уровень экспрессии и ее специфичность в отношении типа клеток, (2) функциональная реаранжировка гена, (3) активация исключения аллеля и ответ на него, (4) экспрессия достаточного первичного спектра, (5) сигнальная трансдукция, (6) соматическая гипермутация и (7) доминирование локуса трансгена, кодирующего антитело, в процессе иммунного ответа.

Необязательно должны присутствовать все вышеуказанные критерии. Например, в тех вариантах изобретения, в которых эндогенные локусы генов иммуноглобулинов трансгенного животного функционально разрушены, для трансгена нет необходимости в активации аллельного исключения. Кроме того, в тех вариантах изобретения, в которых трансген содержит функционально реаранжированный ген тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина, необязательным является второй критерий функциональной реаранжировки гена, по меньшей мере, для того трансгена, который уже является реаранжированным. Сведения общего характера о молекулярной иммунологии см. в *Fundamental Immunology*, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

В других вариантах изобретения трансгенные или трансхромосомные отличные от человека животные, используемые для получения человеческих моноклональных антител по изобретению, содержат реаранжированные, нерееаранжированные или комбинацию реаранжированных и нерееаранжированных гетерологических трансгенов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина в зародышевой линии трансгенного животного. Каждый из трансгенов тяжелой цепи содержит по меньшей мере один C_H ген. Кроме того, трансген тяжелой цепи может содержать функциональные последовательности-переключатели изоформы, которые способны поддерживать переключение изоформы многих кодирующих C_H генов гетерологического трансгена в В-клетках трансгенного животного. Такими последовательностями-переключателями могут быть такие последовательности, которые встречаются в природе в локусе зародышевой линии иммуноглобулина вида, который служит в качестве источника C_H генов трансгена, или такие последовательности переключатели могут быть образованы из последовательностей, которые встречаются в виде, применяемом для получения трансгенной конструкции (трансгенное животное). На-

пример, трансгенная конструкция человеческого происхождения, которая применяется для получения трансгенной мыши, может давать большую частоту события переключения изотипа, если она вводит последовательности-переключатели, аналогичные последовательностям-переключателям, которые встречаются в природе в локусе мышинной тяжелой цепи, так как, предположительно, мышинные последовательности-переключатели оптимизированы таким образом, чтобы функционировать с системой фермента рекомбиназы, тогда как последовательности-переключатели человеческого происхождения не оптимизированы. Последовательности-переключатели можно выделить и клонировать обычными методами клонирования или их можно синтезировать *de novo* из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов, созданных на основе опубликованной информации о последовательностях, относящихся к последовательностям области переключения (Mills et al., Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Sideras et al., Intl. Immunol. 1:631-642 (1989)). В случае каждого из вышеприведенных трансгенных животных функционально реаранжированные гетерологические трансгены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина обнаружены в значительной части В-клеток трансгенного животного (по меньшей мере 10%).

Трансгены, используемые для получения трансгенных отличных от человека животных по изобретению, включают трансген тяжелой цепи, содержащий ДНК, кодирующую по меньшей мере один переменный сегмент гена, один D сегмент, один соединяющий сегмент гена и по меньшей мере один сегмент константной области гена. Трансген легкой цепи иммуноглобулина содержит ДНК, кодирующую по меньшей мере один переменный сегмент гена, один соединяющий сегмент гена и по меньшей мере один сегмент константной области гена. Сегменты гена, "кодирующие" (вернее, соответствующие) сегменты (сегментам) генов легкой и тяжелой цепей, являются гетерологическими для трансгенного животного в том отношении, что они образованы из или соотносятся с ДНК, соответствующей сегментам генов тяжелой и легкой цепи, вида, не состоящего из трансгенного отличного от человека животного. В одном аспекте изобретения трансген построен таким образом, что отдельные сегменты гена являются неаранжированными, т.е. трансген не аранжирован так, чтобы кодировать функциональную легкую или тяжелую цепь иммуноглобулина. Такие неаранжированные трансгены содействуют рекомбинации V, D и J сегментов гена (функциональная реаранжировка) и предпочтительно содействуют включению всего или части D сегмента гена в полученную в результате реаранжированную тяжелую цепь иммуноглобулина в трансгенном животном при экспозиции с антигеном CD20.

В альтернативном варианте изобретения трансгены содержат неаранжированный "минилокус". Такие трансгены, как правило, содержат значительную часть C, D и J сегментов, а также "субпопуляцию" сегментов V генов. В таких трансгенных конструкциях различные регуляторные последовательности, например промоторы, энхансеры, области-переключатели класса, последовательности доноров и акцепторов сплайсинга для процессирования РНК, сигналы рекомбинации и т.п., содержат соответствующие последовательности гетерологической ДНК. Такие регуляторные последовательности могут быть включены в трансген того же самого или родственного вида отличного от человека животного, используемого в изобретении. Например, сегменты гена человеческого иммуноглобулина можно соединять в трансгене с энхансерной последовательностью иммуноглобулина грызунов для использования в трансгенной мыши. Или же, синтетические регуляторные последовательности могут быть включены в трансген, в котором такие синтетические регуляторные последовательности не являются гомологичными функциональной последовательности ДНК, о которой известно, что она встречается в природе в геномах млекопитающих. Синтетические регуляторные последовательности строят по правилам согласованности (консенсуса), так, например, регуляторные последовательности, которые обуславливают разрешенную последовательность акцепторного сайта сплайсинга или промоторный/энхансерный мотив. Например, минилокус содержит часть локуса генома иммуноглобулина, имеющего по меньшей мере одну внутреннюю делецию (т.е. не на конце участка) заменимого участка ДНК (например, интрон или его часть) по сравнению с природным Ig локусом зародышевой линии.

Предпочтительные трансгенные и трансхромосомные отличные от человека животные, например мыши, продуцируют значительный спектр иммуноглобулинов, практически в идеале похожий на спектр иммуноглобулинов человека после поправки на объем.

Спектр в идеале приближается к спектру человека после поправки на объем обычно при разнообразии по меньшей мере около 10%, предпочтительно 25-50% или более. В целом получается по меньшей мере тысяча различных иммуноглобулинов (в идеале IgG), предпочтительно 10^4 - 10^6 или более в зависимости от числа различных V, J и D областей, введенных в геном мыши и управляемых дополнительным разнообразием, вызванным реаранжировками V-(D)-J сегментов гена, случайных добавлений в соединяющие области. Как правило, иммуноглобулины проявляют аффинность (K_D) к предварительно выбранным антигенам ниже 10^{-7} M, такую как аффинность более низкая чем 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M или даже ниже.

Трансгенные и трансхромосомные отличные от человека животные, например мыши, описанные выше, могут быть иммунизированы, например, клетками, экспрессирующими CD20. Или же, трансгенные животные могут быть иммунизированы ДНК, кодирующей человеческие CD20. Животные, которые затем продуцируют В-клетки, которые претерпевают переключение класса путем рекомбинации-переключения (цис-переключение) и экспрессируют иммуноглобулины, реактивные в отношении CD20.

Иммуноглобулины могут представлять собой человеческие антитела (также называемые "антитела с последовательностями человеческого происхождения), в которых полипептиды тяжелой и легкой цепей кодируются последовательностями трангена человеческого происхождения, которые могут включать последовательности, образованные при использовании соматической мутации и рекомбинаторных (рекомбинированных) соединений V области, а также последовательности, кодируемые генами зародышевой линии; эти человеческие антитела можно считать практически идентичными полипептидной последовательности, кодируемой сегментами V_L и J_L или V_H , D_H и J_H генов человеческого происхождения, даже несмотря на то, что в результате соматической мутации и различия V-J и V-D-J рекомбинированных соединяющих частей могут присутствовать другие последовательности незародышевой линии. Варибельные области каждой цепи антитела, как правило, по меньшей мере на 80% аналогичны сегментам V, J и в случае тяжелых цепей D генов зародышевой цепи человеческого происхождения; часто по меньшей мере на 85% аналогичны последовательностям зародышевой линии в трансгене; часто на 90 и 95% аналогичны последовательностям зародышевой линии в трансгене. Однако, так как последовательности не-человеческой зародышевой линии вводятся соматической мутацией и VJ и VDJ соединением, антитела с последовательностью человеческого происхождения часто будут иметь некоторые последовательности варибельной области, которые не кодируются сегментами V, D или J гена человеческого происхождения, обнаруженными в трансгене(ах) человеческого происхождения в зародышевой линии мышей. Как правило, последовательности не-человеческого происхождения (или отдельные положения нуклеотидов) являются кластером в или около CDR, или в областях, где соматические мутации известны кластеру.

Другой аспект изобретения включает В-клетки трансгенных или трансхромосомных отличных от человека животных по данному описанию. В-клетки можно использовать для получения гибридом, экспрессирующих человеческие моноклональные антитела, которые связываются с высокой аффинностью (например, константа равновесной диссоциации (K_D) ниже 10^{-7} М) с человеческими CD20. Так, в одном варианте изобретения включает гибридому, которая продуцирует человеческое антитело, имеющее аффинность (K_D) ниже 10^{-7} М, такую как аффинность более низкая чем 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, если ее определять, анализируя клетки, экспрессирующие CD20, по методу Скэтчарда, используя меченное радиоактивной меткой моноклональное антитело, или определяя полумаксимальную концентрацию связывания, используя FACS анализ.

Моноклональные антитела по данному описанию содержат легкую цепь с последовательностью человеческого происхождения, состоящую из (1) варибельной области легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность, практически идентичную полипептидной последовательности, кодируемой генным сегментом V_L человеческого происхождения и генным сегментом J_L человеческого происхождения, и 2) константной области легкой цепи, кодируемой генным сегментом C_L человеческого происхождения, и тяжелую цепь с последовательностью человеческого происхождения, состоящую из (1) варибельной области тяжелой цепи, имеющей полипептидную последовательность, практически идентичную полипептидной последовательности, кодируемой генным сегментом V_H человеческого происхождения, областью D и генным сегментом J_H человеческого происхождения, и 2) константной области тяжелой цепи, кодируемой генным сегментом C_L человеческого происхождения.

Создание человеческих моноклональных антител с высокой аффинностью против CD20 можно упростить с помощью метода расширения спектра сегментов варибельной области гена человеческого происхождения в трансгенном отличном от человека животном, имеющем геном, содержащий интегрированный транген человеческого иммуноглобулина, причем указанный метод включает введение в геном трансгена V гена, содержащий генные сегменты V области, которые отсутствуют в указанном интегрированном трансгене человеческого иммуноглобулина. Часто транген V области представляет собой искусственную хромосому дрожжей, содержащую часть набора генных сегментов V_H и V_L (V_K) человеческого происхождения, которые могут встречаться в геноме человека или могут быть отдельно вырезаны при сплайсинге вместе методами рекомбинантной ДНК, которые могут включать нестандартные (выпадающие) V-генные сегменты. Часто по меньшей мере пять или более функциональных V-генных сегментов содержится на YAC (искусственных хромосомах дрожжей, и.х.д.). В этом варианте возможно получить трансгенное животное методом расширения V спектра, при этом животное экспрессирует цепь иммуноглобулина, содержащую последовательность варибельного домена, кодируемую сегментом V-генной области, присутствующим в трансгене V области, и C области, кодируемой трансгеном человеческого Ig. С помощью метода расширения V спектра можно получать трансгенные животные, имеющие по меньшей мере 5 различных V генов; а также можно получить животных, содержащих по меньшей мере около 24 V генов. Некоторые V-генные сегменты могут быть нефункциональными (например, псевдогены и т.п.); эти сегменты, если требуется, можно сохранять или можно селективно делетировать (удалять) методами рекомбинантной ДНК, доступными специалистам в данной области техники.

Когда методом рекомбинантной ДНК мышьяная последовательность зародышевой линии создана таким образом, чтобы содержать функциональную YAC, имеющую расширенный спектр V сегментов, практически отсутствующих в трансгене человеческого Ig, содержащем J и C генные сегменты, признак можно размножить и "развести" в других генетических средах, включая среды, в которых функциональ-

ные YAC, имеющие расширенный спектр V сегментов, введены в зародышевую линию отличного от человека животного, имеющую трансген другого человеческого Ig. Многие функциональные YAC, имеющие расширенный спектр V сегментов, можно ввести в зародышевую линию для работы с трансгеном человеческого Ig (или многими трансгенами человеческого Ig). Хотя такие трансгены в данном описании называются YAC трансгенами, такие трансгены, будучи интегрированы в геном, могут практически утратить последовательности дрожжей, такие как последовательности, требуемые для автономной репликации в дрожжах; такие последовательности могут, необязательно, быть удалены методом рекомбинантной ДНК (например, рестрикцией при гидролизе и гель-электрофорезом в пульсирующем электрическом поле или другим подходящим методом) после репликации в дрожжах, они более не нужны (например, перед введением в мышиную клетку ES или мышинный фагоцит). Методы распространения признака экспрессии иммуноглобулина с последовательностями человеческого происхождения включают разведение трансгенного животного, имеющего трансген(-ы) человеческого Ig, и, необязательно, также имеющего функциональную YAC с расширенным спектром V сегментов. Как V_H , так и V_L генные сегменты могут присутствовать на YAC. Трансгенное животное можно разводить в любой (генной) среде, нужной практике, включая среды, содержащие другие трансгены человеческого происхождения, включающие трансгены человеческих Ig и/или трансгены, кодирующие другие белки человеческих лимфоцитов. Изобретение также включает высокоаффинный иммуноглобулин с последовательностью человеческого происхождения, продуцируемый трансгенной мышью, имеющей трансген с YAC, содержащей расширенный спектр V области. Хотя вышесказанное описывает предпочтительный вариант трансгенного животного по изобретению, рассматриваются другие варианты изобретения, которые делятся на три класса:

I) трансгенные животные, содержащие трансген иммуноглобулина с неаранжированной тяжелой и реаранжированной легкой цепью;

II) трансгенные животные, содержащие трансген иммуноглобулина с неаранжированной тяжелой и неаранжированной легкой цепью;

III) трансгенные животные, содержащие трансген иммуноглобулина с реаранжированной тяжелой и неаранжированной легкой цепью.

Порядок предпочтительности этих классов (категорий) трансгенного животного следующий: I>II>III, где гены с эндогенной легкой цепью (или, по меньшей мере, K ген) нокаутированы с помощью гомологичной рекомбинации (или другим методом), и I>II>III, где гены с эндогенной легкой цепью не нокаутированы и должны быть доминирующими при использовании аллельного исключения.

III. Биспецифические/полиспецифические молекулы, связывающиеся с CD20.

Еще в одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела к CD20 могут быть диверсифицированы или связаны с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, с Fab' фрагментом) с образованием биспецифической или полиспецифической молекулы, которая связывается со многими сайтами связывания или эпитопами-мишенями. Например, антитело по изобретению может быть функционально связано (например, химической связью, генетического слияния (гибридизации), нековалентной ассоциации или иным способом) с одной или более связующих молекул, таких как другое антитело, пептид или связующий миметик.

Соответственно настоящее изобретение включает биспецифические и полиспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну специфичность связывания с CD20 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом-мишенью. В особом варианте изобретения вторым нацеленным эпитопом (эпитопом-мишенью) является Fc-рецептор, человеческий FcγRI (CD64) рецептор или человеческий Fcα рецептор (CD89), или T-клеточный рецептор, например CD3. Следовательно, изобретение включает биспецифические и полиспецифические молекулы, способные связываться с эффекторными клетками, экспрессирующими как FcγR, FcαR, так и FcεR (например, моноцитами, макрофагами или полиморфонуклеарами (PMN)) и с клетками-мишенями, экспрессирующими CD20. Эти биспецифические и полиспецифические молекулы нацеливают клетки, экспрессирующие CD20, на эффекторную клетку и, подобно человеческим моноклональным антителам по изобретению, включают активности эффекторных клеток, опосредованные Fc-рецептором, такие как фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD20, антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), высвобождение цитокинов или образование аниона супероксида.

Далее, биспецифические и полиспецифические молекулы по изобретению могут включать третью специфичность связывания, помимо анти-Fc специфичности связывания и анти-CD20 специфичности связывания. В одном варианте изобретения третья специфичность связывания представляет собой участок (часть) фактора противоусиления (anti-enhancement) (EF), например молекула, которая связывается с поверхностным белком, включена в цитотоксическую активность и тем самым повышает иммунный ответ на клетку-мишень. Участком (частью) фактора противоусиления (anti-enhancement) (EF) может быть антитело, функциональный фрагмент антитела или лиганд, который связывается с данной молекулой, например антиген или рецептор, и тем самым приводит к усилению влияния детерминант связывания на Fc-рецептор или антиген клетки-мишени. "Участок фактора противоусиления" может связываться с объектом, отличным от объекта, с которым связываются первая и вторая специфичности. Например,

участок связывания может связывать цитотоксическую Т-клетку (например, через CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 или другая иммунная клетка, которая приводит к повышенному иммунному ответу против клетки-мишени).

В одном варианте изобретения биспецифические и полиспецифические молекулы по изобретению содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело, включая Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может димером легкой или тяжелой цепи или его минимальным фрагментом, таким как Fv, или одноцепочечной конструкцией, описанной Ladner et al. в патенте США 4946778. Антитело может также быть химерным белком связывающего домена иммуноглобулина, описанного в патентных заявках США 2003/0118592 и 2003/0133939.

В одном варианте изобретения биспецифические и моноспецифические молекулы по изобретению содержат специфичность связывания с FcγR или FcαR на поверхности эффекторной клетки, а вторая специфичность связывания с антигеном клетки-мишени, например CD20.

В одном варианте изобретения специфичность связывания с Fc-рецептором обеспечивается человеческим моноклональным антителом, связывание которого не блокируется человеческим иммуноглобулином G (IgG). Применяемый в данном описании термин "IgG рецептор" относится к любому из восьми генов γ-цепи, локализованных на хромосоме 1. Эти гены кодируют всего двенадцать изоформ мембранных или растворимых рецепторов, которые группируются в три класса Fcγ рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). В одном предпочтительном варианте изобретения Fcγ представляет собой человеческий высокоаффинный FcγRI.

Продуцирование и характеристика этих предпочтительных моноклональных антител описаны Fanger et al. в Международной заявке WO 88/00052 и в патенте США 4954617. Эти антитела связываются с эпитопом FcγRI, FcγRII и FcγRIII в сайте, который отличен от сайта связывания Fcγ рецептора, и, таким образом, их связывание практически не блокируется физиологическими уровнями IgG. Специфическими антителами против FcγRI, применимыми по данному изобретению, являются mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 и mAb 197. В других вариантах изобретения анти-Fcγ рецепторное антитело представляет собой гуманизированную форму моноклонального антитела 22 (H22).

Продуцирование и характеристика антитела H22 описано в Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 и в Международной заявке WO 94/10332. Клеточная линия, продуцирующая H22 антитело, депонирована в Американской коллекции типовых клеточных культур 4 ноября 1992 г. под названием HA022CL1 и имеет No. CRL 11177.

В других предпочтительных вариантах изобретения специфичность связывания с Fc-рецептором обеспечивается антителом, которое связывается с рецептором человеческого IgA, например с Fcα рецептором (FcαRI (CD89)), связывание которого предпочтительно не блокируется человеческим иммуноглобулином A (IgA). Предполагается, что термин "IgA рецептор" включает генный продукт α-гена (FcαRI), локализованный на хромосоме 19. Известно, что этот ген кодирует несколько альтернативно вырезанных при сплайсинге трансмембранных изоформ от 55 до 110 кДа. FcαRI (CD89) конститутивно экспрессируется на моноцитах/макрофагах, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитах, но не на популяции не-эффекторных клеток. FcαRI имеет аффинность среды как в отношении IgA1, так и в отношении IgA2, которая повышается при экспозиции с цитокинами, такими как G-CSF или GM-CSF (Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). Четыре FcαRI-специфических моноклональных антитела, идентифицированные как A3, A59, A62 и A77, связывают FcαRI вне лигандсвязывающего домена IgA, описаны Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764.

FcαRI и FcγRI являются предпочтительными триггерными рецепторами для применения по изобретению, так как они (1) экспрессируются первично на иммунных эффекторных клетках; (2) экспрессируются с высокими уровнями (например, 5000-1000000 на клетку); (3) являются медиаторами цитотоксических активностей (например, ADCC, фагоцитоза); (4) опосредуют повышенную антигенную презентацию антигенов, включая аутоантигены, нацеленные на них.

В другом варианте изобретения биспецифическая молекула составлена двумя моноклональными антителами по изобретению, которые имеют комплементарные функциональные активности, так что одно антитело преимущественно работает, индуцируя CDC, а другое антитело преимущественно работает, индуцируя апоптоз, например, 2F2 в комбинации с 11B8.

В других вариантах изобретения биспецифические и полиспецифические молекулы по изобретению дополнительно содержат активность связывания, которая распознает антиген клетки-мишени, например связывается с антигеном клетки-мишени, например, с CD20. В предпочтительном варианте изобретения специфичность связывания обеспечивается с помощью человеческого моноклонального антитела по данному изобретению.

Выражение "специфическое антитело эффекторной клетки" по данному описанию относится к антителу или функциональному фрагменту антитела, которые связываются с эффекторными клетками. Предпочтительные антитела для применения в качестве предмета изобретения связываются с эффекторными клетками по сайту, который не связан эндогенным иммуноглобулином.

Применяемый в данном описании термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, ко-

торая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в противоположность когнитивной фазе и фазе активации иммунного ответа. Примеры иммунных клеток включают клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например лимфоциты (например, В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL), киллерные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, полиморфонуклеары, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и выполняют иммунные функции. В предпочтительных вариантах изобретения эффекторная клетка способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), например нейтрофил, способный индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в (включены) в специфическом киллинге клеток-мишеней и презентации антигенов другим компонентам иммунной системы или в связывании с клетками, которые содержат (презентируют) антигены. В других вариантах изобретения эффекторная клетка может фагоцитировать нацеленный антиген, клетку-мишень или микроорганизм. Экспрессия конкретного FcR на эффекторной клетке может регулироваться гуморальными факторами, такими как цитокины. Найдено, например, что экспрессия FcγRI позитивно регулируется интерфероном гамма (IFN-γ). Эта повышенная экспрессия повышает цитотоксическую активность FcγRI-несущих клеток против мишеней. Эффекторная клетка может фагоцитировать или лизировать антиген-мишень или клетку-мишень.

Термин "клетка-мишень" должен означать любую нежелательную клетку субъекта (например, человека или животного), которая может быть целью композиции (например, моноклонального антитела, биспецифической или полиспецифической молекулы) по изобретению. В предпочтительных вариантах изобретения клетка-мишень представляет собой клетку, экспрессирующую или сверхэкспрессирующую CD20. Клетки, экспрессирующие CD20, как правило, включают В-клетки и В-клеточные опухоли.

Хотя предпочтительными являются человеческие моноклональные антитела, в биспецифических и моноспецифических молекулах по данному изобретению могут использоваться другие антитела, а именно мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела. Такие мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела можно получать известными в технике методами.

Биспецифические и полиспецифические молекулы по настоящему изобретению можно получать химическими методами (см., например, D.M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807), методами "полидома" (см. патент США 4474893, выданный Reading) или методами рекомбинантной ДНК.

В частности, биспецифические и моноспецифические молекулы по данному изобретению можно получать конъюгацией компонентов специфичностей связывания, например специфичностей связывания против FcR и CD20, применяя методы, известные в технике и описанные в примерах в данном описании. Например, каждую специфичность связывания биспецифической и полиспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать множество линкеров и сшивающих агентов. Примеры сшивающих агентов включают протеин А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеинимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидинил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M.A. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие методы включают методы, описанные Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229:81-83) и Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Предпочтительными конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба выпускаются Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если специфичности связывания представляют собой антитела, их можно конъюгировать с помощью связывания сульфгидрильных групп С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В особенно предпочтительном варианте изобретения шарнирная область модифицирована таким образом, чтобы перед конъюгацией содержать нечетное число сульфгидрильных остатков, предпочтительно один.

Или же, обе специфичности связывания можно кодировать в одном и том же векторе и экспрессировать в той же самой клетке-хозяине. Этот метод особенно применим в тех случаях, когда биспецифическая и полиспецифическая молекула представляет собой mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд×Fab химерный белок. Биспецифическая и полиспецифическая молекула по изобретению, например биспецифическая молекула, может быть одноцепочечной молекулой, такой как одноцепочечное биспецифическое антитело, одноцепочечная биспецифическая молекула, содержащая две детерминанты связывания. Биспецифические и полиспецифические молекулы могут также представлять собой одноцепочечные молекулы или, по меньшей мере, могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Методы получения би- и полиспецифических молекул описаны, например, в патентах США 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических и полиспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтвердить твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (RIA), анализом FACS, биоанализом (например, ингибированием роста) или вестерн-блоттингом. Каждый из этих анализов, как правило, обнаруживает присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с помощью меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении

представляющего интерес комплекса. Например, комплексы FcR-антитело можно обнаружить, используя, например, антитело, связанное с ферментом, или фрагмент антитела, который распознает и специфически связывается с комплексами антитело-FcR. Или же, комплексы можно обнаруживать, используя любой из множества других иммуноанализов. Например, антитело можно метить радиоактивной меткой и использовать в радиоиммуноанализе (RIA) (см., например, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). Радиоактивный изотоп можно обнаружить такими способами, как применение счетчика γ -излучения или сцинтилляционного счетчика, или ауторадиографии.

IV. Иммуноконъюгаты.

В другом аспекте настоящее изобретение включает человеческое моноклональное антитело против CD20, конъюгированное с терапевтической частицей, такой как цитотоксин, лекарственным веществом (например, иммуносупрессором) или радиоизотопом. Такие конъюгаты называются в данном описании "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают один или более цитотоксинов, называются "иммунотоксинами". Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который является вредным для клеток (например, убивает клетки). Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, эпозид, тенопозид, винкристин, винбластин, доксорубин, даунорубин, дигидроксидантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

Подходящие терапевтические агенты для образования иммуноконъюгатов по изобретению включают, но без ограничения, антимаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флюдарабин, 5-флуорурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиоера, хлорамбуцил, мельфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платина (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (прежнее название дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин). В предпочтительном варианте изобретения терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент или радиотоксический агент. В другом варианте изобретения терапевтическим агентом является иммуносупрессор. Еще в одном варианте изобретения терапевтическим агентом является GM-CSF. В предпочтительном варианте изобретения терапевтическим агентом является доксорубин, цисплатин, блеомицин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид или ридин А.

Антитела по данному изобретению также могут быть конъюгированы с радиоизотопом, например, таким как йод-131, иттрий-111, для получения цитотоксических радиофармацевтических средств для лечения нарушения, связанного с CD20, такого как рак. Конъюгаты антител по изобретению можно использовать для модификации данного биологического ответа, а долю лекарственного вещества не следует конструировать как ограничивающуюся классическими химическими терапевтическими агентами. Например, доля (элемент, частица, фрагмент) лекарственного вещества может представлять собой белок или полипептид, обладающий заданной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, ридин А, экзотоксин псевдомонад или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухолевых клеток или интерферон- γ ; или модификаторы биологического ответа, например, такие как лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GF-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF") или другие факторы роста.

Методы конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителами хорошо известны, см., например, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985), Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58(1982).

Еще в одном варианте человеческие моноклональные антитела по изобретению присоединены к линкеру-хелатору, например тиуксетану, который способствует конъюгации антитела с радиоизотопом.

V. Фармацевтические композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение включает композицию, например фармацевтическую композицию, содержащую одно или комбинацию человеческих моноклональных антител по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции можно готовить с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с другими известными адъювантами и эксципиентами обычными методами, такими как методы, описанные в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Genaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. В одном варианте изобретения композиции включают комбинацию нескольких (например, двух или более) выделенных человеческих антител по изобретению, которые действуют по различным механизмам, например одно антитело, которое действует, преимущественно индуцируя CDC, в комбинации с другим антителом, которое действует, преимущественно индуцируя апоптоз.

Фармацевтические композиции по изобретению можно также применять в комбинированной терапии, т.е. комбинировать с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать композицию по настоящему изобретению по меньшей мере с одним противовоспалительным агентом и по меньшей мере с одним иммунодепрессантом. В одном варианте изобретения такие терапевтические агенты включают один или более противовоспалительных агентов, таких как стероидные лекарственные средства или НСПВС (нестероидные противовоспалительные средства). Предпочтительные агенты включают, например, аспирин и другие салицилаты, Cox-2 ингибиторы, такие как рофекоксиб (Vioxx) и целекоксиб (Celebrex), НСПВС, такие как ибупрофен (Motrin, Advil), фенпрофен (налфон), напрофен (напросин), сулиндак (клинорил), диклофенак (вольтарен), пироксикам (фелден), кетопрофен (орудис), дифлунизал (долобид), набуметон (релафен), этодолак (лодин), оксапрозин (дайпро) и индометацин (индоцин).

В другом варианте изобретения такие терапевтические агенты включают одно или более модифицирующих заболевание противоревматических лекарственных средств (DMARD), таких как метотрексат (ревматрекс), гидроксихлорокин (плакенил), сульфасалазин (асульфидин), ингибиторы синтеза пиримидина, например лефлуномид (Арава), блокаторы IL-1 рецептора, например анакинра (кинерет), и блокаторы TNF- α , например этанерсепт (энбрел), инфликсимаб (ремикад) и адалимумаб.

В другом варианте изобретения такие агенты включают один или более иммунодепрессантов, таких как циклоспорин (сандиммун, неорал) и азатиоприн (имирал).

В другом варианте изобретения такие терапевтические агенты включают один или более химиотерапевтических агентов, таких как доксорубин (адриамицин), цисплатин (платинол), блеомицин (бленоксан), кармустин (глиадел), циклофосфамид (цитоксан, процитокс, неосар) и хлорамбуцил (леукеран).

В одном варианте человеческие антитела по данному изобретению могут вводиться в комбинации с хлорамбуцилом и преднизолоном; циклофосфамидом; винкристином; доксорубицином и преднизолоном; флударабином и антрациклином или в комбинации с другими обычными схемами полилекарственной терапии для NHL, такими, которые описаны, например, в Non-Hodgkin's Lymphomas: Making sense of Diagnosis, Treatment, and Options, Lorraine Johnston, 1999, O'Reilly and Associates, Inc.

Еще в одном варианте изобретения человеческие антитела можно вводить в сочетании с лучевой терапией и/или с аутотрансплантацией периферических стволовых клеток или костного мозга.

Еще в одном варианте изобретения человеческие антитела можно вводить в комбинации с одним или более антител, выбранных из антител против CD25, антител против CD19, антител против CD21, антител против CD22, антител против CD37, антител против CD38, антител против IL6R, антител против IL8, антител против IL15, антител против IL15K, антител против CD4, антител против CD11a (например, эфализумаб), антител против альфа-4/бета-1 интегрина (VLA4) (например, натализумаб), и CTLA4-Ig.

В особом варианте изобретения человеческие моноклональные антитела вводят в комбинации с антителом против CD25 для лечения буллезного пемфигоида, например, у больных гомологичной болезнью.

В другом особом варианте изобретения человеческие моноклональные антитела вводят в комбинации с одним или более антител, выбранных из антител против CD19, антител против CD21, антител против CD22, антител против CD37 и антител против CD38 для лечения злокачественных опухолей.

Еще в одном варианте изобретения человеческие антитела вводят в комбинации с одним или более антител, выбранных из антител против IL6R, антител против IL8, антител против IL15, антител против IL15R, антител против CD4, антител против CD11a (например, эфализумаб), антител против альфа-4/бета-1 интегрина (VLA4) (например, натализумаб), и CTLA4-Ig для лечения воспалительных заболеваний.

Еще в одном варианте изобретения человеческие антитела можно вводить в комбинации с антителом против C-3b(i) для повышения активации комплемента.

Применяемое в данном описании выражение "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой из перечисленных ниже и все перечисленные ниже физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и снижающие всасывание агенты и т.п. Предпочтительно носитель пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, с помощью инъек-

ции или вливания (инфузии)). В зависимости от способа введения активное соединение, т.е. антители, биспецифическая и полиспецифическая молекула могут быть покрыты оболочкой, чтобы защитить соединение от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Выражение "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет заданную биологическую активность исходного соединения и не имеет никакого нежелательного токсикологического действия (см., например, Berge, S.M. et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают соли, образованные присоединением нетоксических неорганических кислот, таких как хлористо-водородная, азотная фосфорная, серная, бромисто-водородная, йодисто-водородная, фосфорная и т.п., а также нетоксических органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенолзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, ароматические сульфокислоты и т.п. Соли присоединения основания включают соли, образованные присоединением оснований щелочных и щелочно-земельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также нетоксических органических аминов, таких как N,N'-диметилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Композицию по данному изобретению можно вводить различными методами, известными в технике. Как понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения меняется в зависимости от желаемого результата. Активные соединения можно приготовить с носителями, которые предохраняют соединение от быстрого высвобождения, как в препарате пролонгированного действия (с регулируемым выделением), включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как сополимер этилена-винилацетата, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту. Методы приготовления таких препаратов хорошо известны специалистам в данной области техники; см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Для введения соединения по изобретению определенными методами может быть необходимо покрыть соединение оболочкой из материала, предупреждающего инактивирование, или вводить соединение одновременно с этим материалом. Например, соединение можно вводить субъекту в подходящем носителе, например в липосомах, или в разбавителе. Фармацевтически приемлемые разбавители включают физиологический солевой раствор и водные буферные растворы. Липосомы включают эмульсии CGF вода-в-масле-в-воде, а также обычные липосомы (Strejan et al. (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии или стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в технике. Рассматривается применение в фармацевтических композициях по изобретению любых обычных сред или агентов, за исключением тех, которые несовместимы с активным компонентом. В композиции могут вводиться активные добавки.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильны и устойчивы в условиях производства и хранения. Композицию можно готовить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для высоких концентраций лекарственного вещества. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Может сохраняться соответствующая текучесть, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, путем сохранения требуемого гранулометрического состава в случае дисперсии и с помощью поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, полиолы, такие как маннит, сорбит, или хлористый натрий. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно вызвать, включая в композицию агент, который замедляет всасывание, например, солей-моностеаратов и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить, вводя в случае необходимости активное соединение в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним из ингредиентов или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают, вводя активное соединение в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие нужные ингредиенты, выбранные из вышеперечисленных. В случае применения стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными методами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация (сушка в замороженном состоянии), которые дают порошок активного ингредиента плюс любого нужного ингредиента из их раствора, предварительно очищенного стерилизационной микрофильтрацией.

Схемы приема доз корректируют таким образом, чтобы обеспечить оптимальную нужную реакцию (например, терапевтическую реакцию). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько раздельных доз во времени или дозу можно пропорционально снизить или повысить в соответствии с ситуациями, неожиданно возникающими при лечении. Особенно предпочтительными являются

ся парентеральные композиции, приготовленные в виде стандартной лекарственной формы, облегчающей введение и способствующие однородности лекарственной формы. Выражение "стандартная лекарственная форма (доза)" по данному описанию относится к физически дискретным единицам лекарственной формы для проходящих лечения субъектов; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, вычисленное исходя из того, что требуется получить заданный терапевтический эффект в сочетании с нужным фармацевтическим носителем. Технические условия для стандартных лекарственных форм по изобретению диктуются или непосредственно зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который требуется достичь, и (б) ограничений, свойственных технике приготовления препарата из такого активного соединения, для лечения чувствительности у индивидуума.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) масла растворимые антиоксиданты, такие как алкорбилпальмитат, бутилированный гидроксизанизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ИНТ), лецитин, пропиленгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Для терапевтических композиций препараты по настоящему изобретению включают такие препараты, которые пригодны для перорального, назального, местного (включая трансбуккальное и подъязычное), ректальное, вагинальное и/или парентеральное применение. Препараты могут обычно находиться в виде стандартных лекарственных форм (в виде унифицированных доз) и могут быть приготовлены любыми методами, известными в технике фармации. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом носителя для получения стандартной лекарственной формы, в значительной мере зависит от субъекта, проходящего лечение и конкретного способа применения. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом носителя для получения стандартной лекарственной формы, как правило, таково, чтобы композиция вызывала терапевтический эффект. Как правило, если исходить из ста процентов, это количество находится в интервале примерно 0.01-95% активного ингредиента, предпочтительно около 0.1-70%, наиболее предпочтительно около 1-30%.

Препараты по настоящему изобретению, пригодные для вагинального применения, включают также пессарии, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или препараты в виде спрея, содержащие такие носители, которые, как известно в технике, являются подходящими. Лекарственные формы композиций по данному изобретению для местного или трансдермального применения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и летучие препараты для ингаляций. Активное соединение можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми требующимися консервантами, буферами или диспергаторами.

Выражения "парентеральное введение (применение)" и "применяемый парентерально" по данному описанию означают способы введения (применения), иные, нежели энтеральный и местный, обычно с помощью инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, подоболочечную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, интраартикулярную, субкапсулярную, субарахноидную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекции и инфузию.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Должна сохраняться подходящая текучесть, например, за счет использования материалов для покрытия, таких как лецитин, с помощью сохранения гранулометрического состава в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, увлажняющие средства, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предупреждение присутствия микроорганизмов можно обеспечить как с помощью стерилизации, см. выше, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированное всасывание фармацевтической формы для инъекций можно осуществить, включая агенты, которые замедляют всасывание, такие как моностеарат алюминия и желатин.

В одном варианте человеческие моноклональные антитела по изобретению вводят в кристаллической форме в виде подкожной инъекции, ср. Yang et al. (2003) PNAS, 100(12):6934-6939.

Когда соединения по настоящему изобретению вводят в виде фармацевтических препаратов людям или животным, их можно давать индивидуально или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, 0.01-99.5% (более предпочтительно 0.1-90%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Вне зависимости от выбранного способа применения, соединения по настоящему изобретению, ко-

торые могут применяться в соответствующей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению готовят в фармацевтически приемлемых лекарственных формах обычными методами, известными специалистам в данной области техники.

Действительные уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получать количество активного ингредиента, эффективное для достижения нужного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, при этом не являясь токсическим для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций по данному изобретению или их сложного эфира, соли или амида, способ применения, время применения, скорость экскреции конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и историю болезни проходящего лечение пациента и другие подобные общеизвестные в медицинской технике факторы.

Врач или ветеринар, имеющий обычный опыт в данной области техники, может легко определить и прописать требуемое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с доз соединений по изобретению, применяемых в фармацевтических композициях по изобретению, более низких, чем требуется, для достижения нужного терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозу до достижения нужного эффекта. Как правило, подходящей суточной дозой соединения по изобретению является такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза, как правило, зависит от описанных выше факторов. Предпочтительно, что введение было внутривенным, внутримышечным, интраперитонеальным или подкожным, предпочтительно проксимальное введение в нужное место. Желательно, чтобы эффективную суточную дозу терапевтической композиции можно было вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно в виде стандартной лекарственной формы. Хотя соединение по настоящему изобретению можно вводить индивидуально, предпочтительно его вводить в виде фармацевтического состава (композиции, препарата).

В одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела по изобретению можно вводить с помощью инфузии в еженедельной дозе 10-500 мг/м², такой как 200-400 мг/м². Такое введение может быть многократным, например 1-8 раз, как, например, 3-5 раз. Введение можно осуществлять в виде непрерывной инфузии (вливания) в течение 2-24 ч, например в течение 2-12 ч.

В другом варианте изобретения человеческие моноклональные антитела вводят с помощью медленного непрерывного вливания, например, в течение более 24 ч, чтобы уменьшить токсические побочные эффекты.

Еще в одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела вводят в еженедельной дозе 250-2000 мг, например в дозе 300, 500, 700, 1000, 1500 или 2000 мг, до 8 раз, например 4-6 раз. Введение можно осуществлять непрерывным вливанием в течение 2-24 ч, например в течение 2-12 ч. Таковую схему при необходимости можно повторить один или более раз, например через 6 или 12 месяцев. Дозировку можно определять или корректировать, измеряя после введения в биологическом образце количество моноклональных антител против CD20 в кровотоке, используя антиидиотипические моноклональные антитела, нацеленные на антитела против CD20.

Еще в одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела вводят в качестве поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

Еще в одном варианте человеческие моноклональные антитела по изобретению можно вводить по схеме, включающей одно вливание человеческого моноклонального антитела против CD20 с последующим вливанием человеческого моноклонального антитела против CD20, конъюгированного с радиоизотопом. Схему можно повторить спустя 7-9 дней.

Терапевтические композиции можно вводить с применением медицинских устройств, известных в технике. Например, в предпочтительном варианте изобретения терапевтическую композицию по изобретению можно вводить с помощью безыгольного гиподермического инъектора, такого как устройства, описанные в патентах США 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; или 4596556. Примеры общеизвестных имплантатов и модулей, применимых в данном изобретении, включают патент США 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для распределения медицинского препарата с регулируемой скоростью; патент США 4486194, в котором описано терапевтическое устройство для введения медицинских препаратов через кожу; патент США 4447233, в котором описан медицинский инфузионный насос для доставки медицинского средства с точной скоростью вливания; патент США 4447224, в котором описан имплантируемое инфузионное устройство с переменной скоростью для непрерывной доставки лекарственного вещества; патент США 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного вещества с многокамерными ячейками; и патент США 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного вещества. Специалистам в данной области техники известны многие другие имплантаты, системы доставки и модули.

В некоторых вариантах человеческие моноклональные антитела по изобретению можно пригото-

вить таким образом, чтобы гарантировать соответствующее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для того чтобы гарантировать, чтобы лекарственные соединения по изобретению проникали (если требуется) через BBB, они должны быть приготовлены, например, в липосомах. О методах получения липосом см., например, патенты США 4522811; 5374548; 5399331. Липосомы могут содержать одну или более частиц, которые селективно переносятся (транспортируются) в специфические клетки или органы, тем самым повышается нацеленная доставка лекарственного вещества (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Примеры нацеленных частиц включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016, принадлежащий Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob Agents Chemother.* 39:180); поверхностно-активный рецептор протеина А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), различные виды которого могут включать рецептуры по изобретению, а также компоненты молекул по изобретению; p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. В одном варианте изобретения лекарственные соединения по изобретению приготовлены в липосомах (инкапсулированы в липосомы); в более предпочтительном варианте изобретения липосомы включают целевую частицу. В наиболее предпочтительном варианте изобретения лекарственные соединения в липосомах доставляются с помощью болюсной инъекции к месту, проксимально к нужной области, например к месту воспаления или инфекции или к опухоли. Композиция должна быть настолько жидкой, чтобы ее можно было легко набирать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях получения и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки.

Еще в одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела по изобретению могут быть приготовлены таким образом, чтобы предупредить или уменьшить их транспорт через плаценту. Это можно сделать методами, известными в технике, например ПЭГированием антител или применением F(ab)₂-фрагментов. Дополнительные ссылки можно сделать на Cunningham-Rundles C., Zhuo Z., Griffith B., Keenan X. (1992). *Biological activities polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation*, *J. Immunol Methods.*, 152:177-190 и на Landor M. (1995) *Maternal-fetal transfer of immunoglobulins*, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 74:279-283. Это особенно важно, когда антитела применяются для лечения или предупреждения повторного самопроизвольного выкидыша.

"Терапевтически эффективную дозу" для терапии опухоли можно определять с помощью объективных ответов опухоли, который может быть полным или частичным. Полный ответ (CR) опухоли определяется как отсутствие клинических, радиологических или других свидетельств заболевания. Заключение о частичном ответе (PR) делают на основании того, что общий размер опухоли уменьшился более чем на 50%. Среднее время развития (прогрессирования) есть мера, которая характеризует продолжительность объективного ответа опухоли.

"Терапевтически эффективная доза" в терапии опухолей может также измеряться ее способностью стабилизировать прогрессирование заболевания. Способность соединения подавлять раковое заболевание можно оценивать на животной модельной системе, которая позволяет прогнозировать эффективность лечения человеческих опухолей. Или же, это свойство композиции можно оценивать, изучая способность соединения подавлять рост клеток или апоптоз, с помощью *in vitro* анализов, известных опытной практике. Терапевтически эффективное количество лекарственного соединения может уменьшить размер опухоли или иным способом ослабить симптомы у субъекта. Рядовой специалист в данной области техники способен определить такие количества на основе таких факторов, как габариты субъекта, симптомы у субъекта и конкретная композиция или конкретный способ, выбранный для применения.

"Терапевтически эффективная доза" при ревматоидном артрите предпочтительно приводит к улучшению по критериям ACR20 предварительного определения улучшения, более предпочтительно приводит к улучшению по критериям ACR50 предварительного определения улучшения и еще более предпочтительно приводит к улучшению по критериям ACR70 предварительного определения улучшения.

Критерии ACR20 предварительного определения улучшения определяют как: $\geq 20\%$ улучшение показателей: числа болезненных суставов (TJC) и числа опухших суставов (SWJ) и $\geq 20\%$ улучшение 3 из 5 следующих оценок: оценка болевых ощущений пациентом (VAS), общая оценка состояния пациентом (VAS), общая оценка состояния врачом (VAS), самооценка пациентом нетрудоспособности (HAQ), реакт в острой фазе (CRP или ESR).

ACR50 и ACR70 определяются таким же способом с улучшениями $\geq 50\%$ и $\geq 70\%$ соответственно. Более подробно см. в Felson et al. в *American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism* (1995) 38:727-735.

Композиция должна быть стерильной и настолько текучей (жидкой), чтобы композицию можно было набирать в шприц. Помимо воды, носителями могут быть изотонический забуференный солевой раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Должна сохраняться соответствующая текучесть, например, с помощью применения покрытия, такого как лецитин, путем сохранения требуемого гранулометрического состава в случае дис-

персии и с помощью применения поверхностно-активного вещества. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических агентов, например сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлористого натрия. Пролонгированного всасывания инъекционных композиций можно достичь, включая в композицию агент, замедляющий всасывание, например моностеарат алюминия или желатин.

Если активное соединение защищено соответствующим образом, описанным выше, соединение можно применять перорально, например, с инертным разбавителем или с усвояемым съедобным носителем.

IV. Применение и способы по изобретению.

Человеческие антитела (включая иммуноконъюгаты, биспецифические/моноспецифические антитела, композиции и другие производные по данному описанию) по данному изобретению имеют многочисленное *in vitro* и *in vivo* применение в диагностике и терапии, включая диагностику и лечение нарушений, включающих клетки, экспрессирующие CD20. Например, антитела можно вводить в клетки в культуре, например, *in vitro* и *ex vivo*, или человеку, например, *in vivo* для лечения, предупреждения и диагностики ряда нарушений. Предполагается, что применяемый в данном описании термин "субъект" включает человека и отличное от человека животное, которые вырабатывают иммунный ответ на человеческие антитела против CD20. Предпочтительные субъекты включают больных людей с нарушениями, которые можно корректировать или ослабить путем подавления или контроля В-клеток (нормальных или злокачественных).

Например, в одном варианте изобретения человеческие антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения субъекта с опухолевым нарушением, например нарушение, характеризующееся присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, включая, например, В-клеточную лимфому, например NHL. Примеры опухолевых заболеваний, которые можно лечить и/или предупредить, включают В-клеточную лимфому, например NHL, включая лейкоз из предшественников В лимфобластных клеток/лимфому и неоплазмы из зрелых В-клеток, например, такие как хронический лимфоцитарный лейкоз из В-клеток (CLL)/малая лимфоцитарная лимфома (SLL), пролимфоцитарный лейкоз из В-клеток, лимфоплазматическая лимфома, лимфома клеток мантии (MCL), фолликулярная лимфома (FL), включая FL низкой степени, средней степени и высокой степени злокачественности, кожная лимфома из клеток фолликулярных центров, В-клеточная лимфома маргинальной зоны (MALT типа, нодального типа и селезенки), волосатоклеточная лейкемия, крупноклеточная диффузная В-клеточная лимфома, лимфома Беркита, плазмацитома, плазмноклеточная миелома, посттрансплантационное лимфо-пролиферативное заболевание, макроглобулинемия Вальденстрема и анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL).

Другими примерами В-клеточных неходжкинских лимфом являются лимфоматоидный гранулематоз, первичная эффузионная лимфома, интраваскулярная В-клеточная лимфома, медиастинальная крупноклеточная В-клеточная лимфома, заболевания тяжелых цепей (включая γ , μ и α заболевание), лимфомы, вызванные терапией иммунодепрессантами, такими как лимфома, вызванная циклоспорином, и лимфома, вызванная метотрексатом.

В другом варианте человеческие антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения лимфомы Ходжкина.

Примеры нарушений иммунной системы, в которых участвуют В-клетки, экспрессирующие CD20, которые можно лечить и/или предупреждать, включают аутоиммунные нарушения, такие как псориаз, псориатический артрит, дерматит, системную склеродерму и склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс-синдром, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзему, астму, атеросклероз, недостаточность адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Сегрена (Шегрена), ювенильный диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, нефрит с отложениями иммунных комплексов, IgA нефропатию, IgM полинейропатию, опосредованную иммунной системой тромбоцитопению, такую как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическую анемию, тяжелую псевдопаралитическую миастению, волчаночный нефрит, системную эритематозную волчанку, ревматоидный артрит (RA, RA), диффузный нейродермит, пузырчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, гранулематоз Вегенера, синдром Оменна, хроническую почечную недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ и болезни, связанные с вирусом герпеса. Другими примерами является острый респираторный дистресс-синдром и хореоретинит. Кроме того, другие заболевания и нарушения включают те из них, которые вызваны или опосредованы инфицированием В-клеток вирусом, таким как вирус Эпштейн-Барра (EBV).

Другие примеры воспалительных, иммунных и/или аутоиммунных нарушений, в которых важную роль играют антитела и/или избыточная активность В-лимфоцитов и которые можно лечить и/или предупреждать, включают следующие заболевания и нарушения:

васкулиты и другие сосудистые заболевания, такие как микроскопические полиангииты, синдром Черга-Штрауса и другие ассоциированные с ANCA васкулиты, узелковый полиартериит, эссенциальный криоглобулинэмический васкулит, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Кавасаки, арте-

риит Такаяши, гигантоклеточный артериит, пурпура Геноха-Шенляйна, первичный или изолированный церебральный ангиит, узловая эритема, облитерирующий тромбангиит, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (включая гемолитический уремический синдром) и вторичные васкулитиды, включая кожный лейкоцитокластический васкулит (например, вторичный, вызванный гепатитом В, гепатитом С, макроглобулинемией Вальденстрема, В-клеточной неоплазией, ревматоидным артритом, синдромом Сегрена (Шегрена) или системным волчаночным эритематозом); другими примерами являются узловая эритема, аллергический васкулит, паникулит, болезнь Вебера-Крисчена, гиперглобулинемическая пурпура и болезнь Бюргера;

кожные заболевания, такие как контактный дерматит, линейный IgA-дерматоз, витилиго, гангренозная пиодермия, приобретенный буллезный эпидермолиз, обыкновенная пузырчатка (включая рубцовый пемфигоид и буллезный пемфигоид), очаговая (гнездная) алопеция (включая универсальную алопецию и полную алопецию), герпетический дерматит, многоформная эритема и хроническая аутоиммунная крапивница (включая ангионевротический отек и уртикарный васкулит);

иммунные цитопении, такие как аутоиммунная нейтропения и истинная красная клеточная аплазия;

нарушения соединительных тканей, такие как CNS (ЦНС) волчанка, дискоидная красная волчанка, CREST синдром, смешанная болезнь соединительной ткани, полимиозит/дерматомиозит, миозит телец включения, вторичный амилоидоз, криоглобулинемия типа I и типа II, фибромиалгия, антифосфолипидный синдром, вторичная гемофилия, рецидивирующий полихондрит, саркоидоз, синдром ригидности мышц шеи ревматическая лихорадка; другим примером является эозинофильный фасцит;

артритиды, такие как анкилозирующий спондилартрит, ювенильный хронический артрит, болезнь Стилла у взрослых и синдром SAPHO; другими примерами являются сакроилеит, реактивный артрит, болезнь Стилла и подагра;

гематологические нарушения, такие как гипопластическая анемия, первичная гемолитическая анемия (включая холодовую агглютининовую болезнь), вторичная гемолитическая анемия вследствие CLL или системной красной волчанки; синдром PORMS, злокачественная анемия и макроглобулинемическая пурпура Вальденстрема; другими примерами являются агранулоцитоз, аутоиммунная нейтропения, болезнь Франклина, болезнь Зелигманна, болезнь μ -цепи, вторичный паранеопластический синдром вследствие тимомы и лимфом и образование ингибитора фактора VIII;

эндокринопатии, такие как полиэндокринопатия и болезнь Аддисона; другими примерами являются аутоиммунная гипогликемия, аутоиммунный гипотиреозидизм, аутоиммунный инсулиновый синдром, тиреоидит де Кервена и опосредуемая антителом к рецептору инсулина инсулиновая резистентность;

болезни печени и желудочно-кишечного тракта, такие как глютеновая болезнь, болезнь Уиппла, первичный билиарный цирроз, хронический активный гепатит и первичный склерозирующий холангит; другим примером является аутоиммунный гастрит;

нефропатии, такие как быстро прогрессирующий гломерулонефрит, постстрептококковый гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, мембранный гломерулонефрит и криоглобулинемический нефрит; другим примером является болезнь минимальных изменений;

нейрологические нарушения, такие как аутоиммунные невропатии, множественный мононеврит, миастенический синдром Ламберта-Итона, хорея Сиденгама, сухотка спинного мозга и синдром Гийена-Барре; другими примерами являются миелопатия/нижний спастический паразез, тяжелая миастеническая миастения, острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия;

сердечные и легочные заболевания, такие как фиброзный альвеолит, облитерирующий бронхиолит, аллергический аспергиллез, муковисцидоз, синдром Леффлера, миокардит и перикардит; другими примерами являются легочная сверхчувствительность и вторичный паранеопластический синдром вследствие рака легкого;

аллергические заболевания, такие как бронхиальная астма и гипер-IgE-синдром; другим примером является преходящая слепота;

глазные болезни, такие как идиопатический хориоретинит;

инфекционные заболевания, такие как инфекция парвовирусом В (включая синдром рук-и-носов (hands-and-socks)); и

акушерско-гинекологические заболевания, такие как привычный выкидыш, привычная потеря плода и задержка внутриутробного роста; другим примером является вторичный паранеопластический синдром вследствие гинекологических новообразований (опухолей);

нарушение репродуктивной функции у мужчин, такое как вторичный паранеопластический синдром вследствие опухолей яичек; и

нарушения, вызванные трансплантацией, такие как отторжение аллотрансплантата и ксенотрансплантата и гомологичная болезнь.

В одном варианте изобретения заболевание является воспалительным, иммунным и/или аутоиммунным заболеванием, выбранным из язвенного колита, болезни Крона, ювенильного диабета, иммунной тромбоцитопении, такой как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, и гемолитической анемии (включая аутоиммунную гемолитическую анемию), тяжелой псевдопаралитической миастении,

системного склероза и обычной пузырьчатки.

В другом варианте изобретения антитела по изобретению можно использовать для обнаружения уровней CD20 или уровней клеток, которые содержат CD20 на поверхности клеточной мембраны, эти уровни можно затем соотнести (связать) с некоторыми симптомами заболевания. Или же, антитела можно использовать для истощения или взаимодействия с функцией клеток, экспрессирующих CD20, тем самым используя (вовлекая) эти клетки в качестве важных медиаторов заболевания. Этого можно достичь при контактировании образца и контрольного образца с антителом против CD20 в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом и CD20. Любые образующиеся в образце и контрольном образце комплексы между антителом и CD20 детектируются и сравниваются.

Человеческие антитела по изобретению можно сначала тестировать на активность связывания, ассоциирующуюся с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, антитела можно проверять, используя методы жидкостной цитометрии, описанные в приведенных ниже примерах. Кроме того, можно проанализировать активность антител при включении по меньшей мере одной опосредованной медиатором активности эффекторных клеток, включая подавление роста и/или киллинга клеток, экспрессирующих CD20. Например, можно анализировать способность антител включать CDC и/или апоптоз. Протоколы анализа на CDC, гомотипическую адгезию, образование молекулярных кластеров или апоптоз описаны в приведенных ниже примерах.

Кроме того, человеческие антитела по изобретению имеют применение в терапии и диагностике ряда заболеваний, связанных с CD20. Например, человеческие антитела можно использовать для выявления *in vivo* или *in vitro* одной или более следующих биологических активностей: подавление роста и/или дифференцировки клеток, экспрессирующих CD20; киллинг клеток, экспрессирующих CD20; опосредование фагоцитоза или ADCC клетки, экспрессирующей CD20 в присутствии человеческих эффекторных клеток; опосредование CDC клетки, экспрессирующей CD20 в присутствии комплемента; опосредование апоптоза клетки, экспрессирующей CD20; индукция гомотипической адгезии и/или индукция транслокации в липидные рафты при связывании CD20.

В особом варианте изобретения человеческие антитела используются *in vivo* для лечения, предупреждения или диагностики ряда заболеваний, обусловленных CD20. Примеры заболеваний, обусловленных CD20, включают, среди других, В-клеточную лимфому, например NHL и иммунные заболевания, например аутоиммунные заболевания, такие как заболевания, описанные выше.

В особом варианте изобретения антитела по изобретению используются для лечения или предупреждения NHL, так как антитела истощают опухолевые клетки, несущие CD20.

Неходжкинская лимфома представляет собой тип В-клеточной лимфомы. Лимфомы, например В-клеточные лимфомы, представляют собой группу родственных раковых заболеваний, которые возникают, когда лимфоцит (клетка крови) становится злокачественным. Нормальной функцией лимфоцитов является защита организма от "захватчиков": микроорганизмов, вирусов, грибов, даже рака. Существует много подтипов и стадий созревания лимфоцитов и, следовательно, существует много видов лимфом. Как нормальные клетки, злокачественные лимфоциты могут мигрировать в различные участки организма. Как правило, клетки лимфом образуют опухоли в лимфатической системе: костном мозге, лимфатических узлах, селезенке и в крови. Однако эти клетки могут мигрировать в другие органы. Некоторые типы лимфомы имеют тенденцию расти в местах, где находится нормальная клетка. Например, фолликулярные NHL опухоли обычно образуются в лимфатических узлах.

Обычно повышенные уровни CD20 экспрессируются на неопластических (т.е. опухолегенных) В-клетках, ассоциированных с NHL. Соответственно антитела по изобретению, связывающие CD20, можно применять для истощения опухолевых клеток, несущих CD20, которые приводят к NHL, и, таким образом, можно применять для предупреждения или лечения этого заболевания.

Человеческие антитела (например, человеческие моноклональные антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы) по настоящему изобретению также можно использовать для блокирования или подавления других эффектов CD20. Известно, например, что CD20 экспрессируются на В-лимфоцитах и вовлечены в пролиферацию и/или дифференцировку этих клеток. Так как лимфоциты работают как иммуномодуляторы, CD20 является важной целью опосредованной антителами терапии в отношении В-лимфоцитов-мишеней, такой, например, как инактивация или киллинг В-лимфоцитов, участвующих в аутоиммунных нарушениях. Такие аутоиммунные нарушения включают, например, вышеперечисленные заболевания.

Подходящие способы введения композиций антител (например, человеческих моноклональных антител, полиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов) по изобретению *in vitro* и *in vivo* общеизвестны в технике и могут быть выбраны рядовым специалистом. Например, композиции антител можно вводить с помощью инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы молекул зависят от возраста и веса субъекта и от концентрации и/или состава композиции антитела. Помимо этого, можно определить опухолевую нагрузку и использовать ее для расчета подходящих доз.

Как описано ранее, человеческие антитела против CD20 по изобретению можно применять вместе с одним или более терапевтическим агентом, например с цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммунодепрессантом. Антитело может быть связано с агентом (в виде иммунокомплекса)

или может применяться отдельно от агента. В последнем случае (раздельное применение) антитело можно вводить до, после агента или одновременно с агентом или может применяться вместе с другими известными способами терапии, например с противораковой терапией, например с облучением. Такие терапевтические агенты включают, наряду с другими, антинеопластические агенты, такие как доксорубин, цисплатин, блеомицин, кармустин, хлорамбуцил и циклофосфамид. Совместное применение человеческих антител против CD20 по настоящему изобретению с химиотерапевтическими агентами обеспечивает наличие двух противораковых агентов, которые работают по различным механизмам, что оказывает цитотоксическое действие на человеческие опухолевые клетки. Такое совместное применение может решить проблемы, возникающие вследствие появления резистентности к лекарственным веществам или изменения антигенности опухолевых клеток, что делает их неактивными в отношении антитела.

Специфические в отношении мишени эффекторные клетки, например эффекторные клетки, связанные с композициями (например, человеческими антителами, полиспецифическими и биспецифическими молекулами) по изобретению, могут также применяться в качестве терапевтических агентов. Эффекторные клетки для нацеливания могут являться человеческими лейкоцитами, такими как макрофаги, нейтрофилы или моноциты. Другие клетки включают эозинофилы, природные клетки-киллеры и другие клетки, несущие рецептор IgG или IgA. При необходимости эффекторные клетки можно получить от субъекта, подвергающегося лечению. Эффекторные клетки, специфические в отношении мишени, можно применять в виде клеточной суспензии в физиологически приемлемом растворе. Число введенных клеток может быть порядка 10^8 - 10^9 , но меняется в зависимости от целей терапии. В целом, количество должно быть достаточным для локализации в клетке-мишени, например в опухолевой клетке, экспрессирующей CD20, и чтобы вызвать гибель клеток, например, с помощью фагоцитоза.

Для удаления целевых клеток терапию специфическими в отношении мишени эффекторными клетками можно осуществлять в сочетании с другими методами. Например, противоопухолевая терапия с применением композиций (например, человеческих антител, полиспецифических и биспецифических молекул) по изобретению и/или эффекторных клеток, "вооруженных" этими композициями, может применяться в сочетании с химиотерапией. Кроме того, комбинированную иммунотерапию можно применять для направления двух отдельных популяций цитотоксических эффекторных клеток на отторжение опухолевых клеток. Например, антитела против CD20, связанные с антителами против FcγRI или против CD3, могут применяться в сочетании с агентами, специфически связывающимися с IgG- или IgA-рецепторами.

Биспецифические и полиспецифические антитела по изобретению можно также применять для модулирования уровней FcγR и FcαR на эффекторных клетках, например, кэпированием и элиминированием рецепторов на клеточной поверхности. Для этой цели можно также применять смеси анти-Fc-рецепторов.

Композиции (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по изобретению, которые содержат сайты связывания комплемента, такие как участки IgG1, -2 или -3 или IgM, которые связывают комплемент, можно также применять в присутствии комплемента. В одном варианте изобретения *ex vivo* обработка популяции клетки, содержащей клетки-мишени, связующим агентом по изобретению и соответствующими эффекторными клетками может быть дополнена добавлением комплемента или сыворотки, содержащей комплемент. Фагоцитоз клеток-мишеней, покрытых связующим агентом по изобретению, можно повысить путем связывания белков комплемента. В другом варианте изобретения клетки-мишени, покрытые композициями (т.е. человеческими антителами, полиспецифическими и биспецифическими частицами) по изобретению можно также лизировать при использовании комплемента. Еще в одном варианте изобретения композиции по изобретению не активируют комплемент.

Композиции (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по изобретению можно также вводить вместе с комплементом. Соответственно в объем изобретения входят композиции, содержащие человеческие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и сыворотку или комплемент. Преимущество этих композиций заключается в том, что комплемент расположен в тесной близости к человеческим антителам, полиспецифическим или биспецифическим молекулам. Или же, человеческие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы по изобретению и комплемент или сыворотку можно вводить раздельно. Связывание композиций по настоящему изобретению с клетками-мишенями вызывает транслокацию комплекса CD20 антиген-антитело в липидные рафты клеточной мембраны. Такая транслокация создает высокую плотность комплексов антиген-антитело, которые могут эффективно активировать и/или повышать CDC.

В объем настоящего изобретения также входят наборы, содержащие композиции антител по изобретению (например, человеческие антитела и иммуноконъюгаты) и инструкции по применению. Кроме того, набор содержит один или более дополнительных реагентов, таких как иммуносупрессор (иммунодепрессант), цитотоксический агент или радиотоксический агент или одно или более дополнительных человеческих антител по изобретению (например, человеческих антител с комплементарной активностью).

Таким образом, пациентам, проходящим лечение композициями антител по изобретению, можно дополнительно вводить (перед, одновременно или после введения человеческого антитела по изобретению) другой терапевтический агент, такой как цитотоксический или радиотоксический агент, который повышает или усиливает терапевтическое действие человеческих антител.

В других вариантах настоящего изобретения субъект можно дополнительно обрабатывать агентом, который модулирует, например повышает или подавляет, экспрессию или активность рецепторов Fcγ или Fcα, например, цитокином. Предпочтительные цитокины для применения в ходе лечения полиспецифическими молекулами включают гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон-γ (IFN-γ) и фактор некроза опухолевых клеток (TNF).

Композиции (например, человеческие антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы) по изобретению можно также применять для нацеливания клеток, экспрессирующих FcγR или CD20, например, для мечения таких клеток. С этой целью связующий агент можно соединять с молекулой, которую можно детектировать. Таким образом, изобретение включает методы локализации *ex vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, такие как FcγR или CD20. Детектируемой меткой может быть, например, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или ферментный кофактор.

В особом варианте изобретение включает методы детектирования присутствия CD20 антигена в образце или определение количества CD20 антигена, заключающиеся в контактировании образца и контрольного образца с человеческим моноклональным антителом, которое специфически связывается с CD20, в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом или его участком и CD20. Затем детектируют образование комплекса, при этом разница в образовании комплекса между образцом и контрольным образцом является показателем присутствия в образце антигена CD20.

В других вариантах настоящее изобретение охватывает методы лечения нарушения, включающие клетки, экспрессирующие CD20 в организме субъекта, например неходжкинскую лимфому или ревматоидный артрит, путем введения субъекту описанных выше человеческих антител. Такие антитела и их производные применяются для подавления стимулированных CD20 активностей, ассоциированных с некоторыми нарушениями, например, пролиферацией и/или дифференцировкой. При контактировании антитела с CD20 (например, при введении антитела субъекту) способность CD20 стимулировать активность подавляется и, таким образом, происходит лечение ассоциированного нарушения.

Соответственно в другом варианте настоящее изобретение включает метод лечения или предупреждения опухолевого нарушения, включающего клетки, экспрессирующие CD20, например NHL. Метод заключается во введении субъекту композиции антитела по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения нарушения. Композицию антитела можно вводить индивидуально или вместе с другим терапевтическим агентом, таким как цитотоксический или радиотоксический агент, который взаимодействует с или действует синергистически с композицией антитела, для лечения или предупреждения заболеваний, в которых участвуют клетки, экспрессирующие CD20. В особенно предпочтительном варианте настоящее изобретение охватывает метод лечения неходжкинской лимфомы.

В другом варианте настоящее изобретение охватывает метод лечения или предупреждения аутоиммунного нарушения, в котором участвуют клетки, экспрессирующие CD20, например заболеваний, перечисленных выше. Способ заключается во введении субъекту композиции антитела по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения нарушения. Композицию антитела можно вводить вместе с другим терапевтическим агентом, таким как иммунодепрессант (иммуносупрессор), который взаимодействует с или действует синергистически с композицией антитела, для лечения или предупреждения заболевания, в котором участвуют клетки, экспрессирующие CD20.

Еще в одном варианте изобретение охватывает способ обнаружения (детектирования) присутствия или определения количества клеток, экспрессирующих CD20, *in vivo* или *in vitro*. Способ включает (i) введение субъекту композиции (например, поли- или биспецифической молекулы) по изобретению, конъюгированной с детектируемым маркером; (ii) экспозиция субъекта со средствами обнаружения указанного детектируемого маркера для идентификации областей, содержащих клетки, экспрессирующие CD20.

Еще в одном варианте изобретения иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать для нацеливания соединений (например, терапевтических агентов, меток, цитотоксинов, радиотоксинов, иммуносупрессоров и т.д.) на клетки с CD20, экспрессированными на их поверхности, путем связывания таких соединений с антителом. Так, изобретение также охватывает методы локализации *ex vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих CD20, таких как клетки Рида-Штернберга (например, с детектируемой меткой, такой как радиоизотоп, флуоресцентным соединением, ферментом или ферментным кофактором). Или же, иммуноконъюгаты можно использовать для киллинга клеток, содержащих CD20, экспрессированные на их поверхности, путем нацеливания цитотоксинов или радиотоксинов на CD20.

Далее настоящее изобретение иллюстрируется нижеприведенными примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

Примеры

В-клеточные линии, используемые в примерах

Линия клеток	Происхождение	Получены от
Дауди (Daudi)	Африканская лимфома Беркитта	ЕСАСС (85011437)
ARH- 77	Лейкоз (IgG типа) плазматических клеток	DCMZ (ACC 512)
ДОНН	Рефракторная иммунобластная В- клеточная лимфома	DCMZ (ACC 47)
Райи (Raji)	Африканская лимфома Беркитта	ЕСАСС (85011429)
SU- DHL- 4	В- NHL, диффузная гистиоцитическая лимфома	DCMZ (ACC 495)
Ramos- EHRB	Лимфома Беркитта	ЕСАСС (85030804)
Tanoue	Человеческий В- клеточный лейкоз	DCMZ (ACC 399)

В-клеточные линии Дауди (Daudi), ARH-77, ДОНН, Райи (Raji), Ramos-EHRB и Tanoue культивируют в культуральной среде RPMI 1640, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS) (Optimum C241, Wisent Inc., st. Bruno, Canada), 2 мМ L-глутамина, 100 М Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 1 мМ пирувата натрия (все Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland).

Линию клеток SU-DHL-4 культивируют в той же самой среде, но без пирувата натрия.

Культуры выдерживают в термостате с увлажненным 5% CO₂ при 37°C, расщепляют и собирают при 80-90% монослое. Среду заменяют свежей дважды в неделю. В это время клетки расщепляют и засевают при плотности 1-1.5×10⁶ клеток/мл для гарантии выживаемости и оптимального роста.

Пример 1. Получение человеческих антител против CD20.

Мыши HCo7 и KM.

Полностью человеческие моноклональные антитела к CD20 получают при использовании мышей HCo7 и KM, которые экспрессируют гены человеческих антител. В штамме KM мышей эндогенную мышиную легкую цепь к гомозиготно разделяют, как описано в Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820, а эндогенную мышиную тяжелую цепь гомозиготно разделяют, как описано в примере 1 РСТ опубликованной Международной заявки WO 01/09187. Этот штамм мышей несет трансген легкой цепи к человеческого происхождения, KCo5, описанный в Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. Этот штамм мышей также несет тяжелую цепь человеческого происхождения в трансхромосоме, состоящую из фрагмента hCF (SC20) хромосомы 14, как описано в Международной заявке WO 02/43478.

У мышей HCo7 имеется JKD разрыв в генах эндогенной легкой цепи (κ) (как описано в Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830), CMD разрыв в генах эндогенной тяжелой цепи (как описано в примере 1 в Международной заявке WO 01/14424), трансген KCo5 легкой цепи к человеческого происхождения (описанный в Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851) и HCo7 трансген тяжелой цепи человеческого происхождения (описанный в патенте США 5770429).

Иммунизация мышей HCo7 и KM.

Мышей HCo7 и KM иммунизируют клетками NS/0, трансфецированными человеческим геном CD20. Для первой иммунизации одной мыши 1×10⁷ клеток в 150 мкл PBS смешивают 1:1 с полным адьювантом Фрейнда и инъецируют интраперитонеально (i.p., внутрибрюшинно). Последующие i.p. иммунизации осуществляют, вводя такое же количество клеток без адьюванта. За три или два дня до слияния мышам вводят в виде бустер-инъекции 0.5×10⁷ клеток, суспендированных в PBS.

Мониторинг присутствия антител к человеческим CD20 в сыворотке мышей проводят проточной цитометрией с помощью анализа FACS, используя клетки NS/0, трансфецированные человеческим геном CD20, а также негативные в отношении CD20 парентальные клетки NS/0.

Генерация гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела к CD20.

Мышиные спленоциты выделяют из мышей HCo7 и KM и сливают с линией клеток мышинной миеломы с помощью ПЭГ в соответствии со стандартным протоколом. Затем проводят скрининг полученных гибридом на продукцию IgG,κ методом ELISA и на специфичность в отношении CD20 FACS анализом, используя трансфецированные с помощью CD20 клетки NS/0 и SKBR3. Суспензии одиночных клеток селезеночных лимфоцитов иммунизированных мышей сливают (гибридизуют) с одной четвертой частью не секретирующих SP2/0 клеток мышинной миеломы (ATCC, CM 1581) в присутствии 50% ПЭГ (Sigma). Клетки засевают в титрационные микропланшеты с плоскодонными лунками при плотности примерно 1×10⁵/лунка и инкубируют примерно в течение двух недель в избирательной среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) кондиционированной среды, 3-5% оригена (origen) (IGEN) в DMEM (Mediatech, CRL 10013, с высоким содержанием глюкозы, L-глутамином и пируватом натрия) плюс 5 мМ HEPES, 0.055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мг/мл гентамицина и 1×НАТ (Sigma, CRL P-7185). Через 1-2 недели клетки культивируют в среде, в которой НАТ заменяют на НТ. Затем отдельные лунки подвергают скринингу проточной цитометрией на человеческие моноклональные IgG антитела против CD20. После начала интенсивного роста гибридом мониторинг среды проводят, как правило, через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитела, пересаживают в планшеты, снова подвергают скринингу и, если они все еще позитивны в отношении человеческого IgG, монокло-

нальные антитела против CD20 субклонировать при ограничении разведения. Стабильные субклоны затем культивируют *in vitro* для получения малых количеств антител в тканевой культуральной среде для определения характеристик. Выбирают один клон каждой гибридомы, сохраняющий реактивность (реакционную способность) родительских клеток (FACS анализ). Получают банк по 5-10 ампул каждого клона и хранят в жидком азоте.

Селекция связывания человеческих моноклональных антител с CD20/первичный скрининг.

Для определения изотипа антител проводят изотипический анализ ELISA. Лунки микротитрационных планшетов покрывают 1 мкг/мл мышинового антитела против легкой цепи к человеческого происхождения, 50 мкл/лунка в PBS, инкубируют при 4°C в течение ночи. После блокирования с помощью 5% куриной сыворотки содержимое планшетов реагирует с супернатантом и очищенным контролем изотипов. Затем планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 1-2 ч. Содержимое лунок реагирует с зондами, конъюгированными с пероксидазой хрена, специфическими в отношении человеческих IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Планшеты обрабатывают и анализируют, как описано выше.

Получают четыре клеточные линии гибридом, три - полученные при слиянии клеток мышей KM и одна - при слиянии клеток мышей HCo7, экспрессирующие следующие антитела:

2F2: человеческое моноклональное IgG1, к антителу с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 1 и 3 и аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2 и 4.

4C9: человеческое моноклональное IgG1, к антителу с точно такими же аминокислотными последовательностями, что и 2F2. SEQ ID NO: 2 и 4.

7D8: человеческое моноклональное IgG1, к антителу с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 5 и 7 и аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 6 и 8.

11B8: человеческое моноклональное IgG3, к антителу с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 9 и 11 и аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 10 и 12.

Термин "2F2" применяют для обозначения как антитело из клона гибридомы 2F2, так и идентичного антитела из клона гибридомы 4C9.

Антитела по изобретению можно переключать в другие изотипы, определяемые при использовании трансгенного или трансхромосомного отличного от человека животного, из которого они получены. В одном варианте изобретения 11B8 человеческое моноклональное IgG3, к антителу можно переключить в человеческое моноклональное антитело IgG1, к изотипа, имеющее точно те же самые V_H и V_L последовательности. В другом варианте изобретения антитело 2F2 IgG1, к или антитело 7D8 IgG1, к можно переключить в человеческие моноклональные антитела IgG2, IgG4, IgA1, IgA2 или IgE изотипа, имеющие точно те же самые V_H и V_L последовательности.

Пример 2. Секвенирование последовательностей человеческих антител против CD20 (установление первичных последовательностей).

Секвенирование областей V_L и V_H .

Получение РНК.

Тотальную РНК получают из 5×10^6 всех клеточных линий гибридомы HuMAb CD20 (2F2, 7D8 и 11B8) с применением набора RNeasy (Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands) в соответствии с протоколом производителя.

Получение кДНК 2F2 и 7D8.

5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) из матрицы РНК получают из 1 мкг тотальной РНК с применением набора для амплификации SMART RACE кДНК (Clontech) в соответствии с протоколом производителя.

V_H и V_L области амплифицируют, используя преимущество набора HF 2 PCR (Clontech, BD) и с применением следующих праймеров:

V_H RACE2 5' GCA GGC ACA CAA CAG AGG CAG TTC CAG ATT TC отжигают в С-каппа

V_L RACE2 5' GCT GTG CCC CCA GAG GTG CTC TTG GAG G отжигают в С_{H1}

Получение кДНК клеток 11B8.

Комплементарную ДНК (кДНК) из матрицы РНК клеток 11B8 получают из 3 мкг тотальной РНК при использовании AMV обратной транскриптазы с буфером (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), олигомера d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, USA), dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) и RNAsin (Promega) в соответствии с протоколом производителя. (2000, версия 3).

ПЦР праймеры, используемые для амплификации V_H и V_L областей для клонирования.

Используемые пары праймеров.

V_H :

FR1 5' праймеры

AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC
 AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC
 AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC

V_H лидерные 5' праймеры

AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC
 AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg
 AB87 ATg gAg TTT ggr CTg AgC Tg
 AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC
 AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT

V_H 3' праймер

AB90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg

V_K :

FR1 5' праймеры

AB8 RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC
 AB9 gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC
 AB10 gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC
 AB11 gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC
 AB12 gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC
 AB13 gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC
 AB14 gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC

V_K лидерные 5' праймеры

AB123 CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg
 AB124 CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC
 AB125 CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC
 AB126 ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC

V_K 3' праймер

AB16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

где K=T или G, S=C или G, R=A или G, Y=C или T и W=A или T.

Условия PCR (ПЦР) амплификации областей V_H и V_L для клонирования 2F2 и 7D8: полимеразную цепную реакцию (PCR, ПЦР) осуществляют с HF полимеразной смесью (Clonetech.) в термоблоке T1 (Biometra, Westburg).

Условия ПЦР:

94 °C 30 сек 5 циклов

72 °C 1 мин

94 °C 30 сек

70 °C 30 сек 5 циклов

72 °C 1 мин

94 °C 30 сек

68 °C 30 сек 27- 30 циклов

72 °C 1 мин

Условия PCR (ПЦР) амплификации областей V_H и V_L для клонирования 11B8.

Полимеразную цепную реакцию (PCR, ПЦР) осуществляют с AmpliTaq полимеразой (Perkin Elmer)

в термоблоке T1 (Biometra, Westburg, Leusden, Netherlands).

Протокол ПЦР циклизации:

	94 °C 2 мин
11 циклов	70 °C 30 сек
	65 °C 30 сек, минус 1 °C на цикл
	72 °C 30 сек
30 циклов	94 °C 30 сек
	55 °C 30 сек
	72 °C 30 сек
	73 °C 10 мин

охлаждают до 4 °C

Клонирование V_H и V_L в pGEMT-векторной системе II (2F2, 7D8 и 11B8).

После анализа продуктов ПЦР на агарозном геле продукты очищают при использовании набора QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands). Два независимо амплифицированных продукта ПЦР каждой V_H и V_L области клонируют в pGEMT-векторной системе II (Promega) в соответствии с протоколом производителя. (1999, версия 6).

После трансформации в *E. coli* JM109 отдельные колонии подвергают скринингу с помощью ПЦР колоний, используя праймеры T7 и SP6, 30 циклов отжига при 55°C. Плазмиду ДНК из колоний очищают, используя минипрепаративный набор Qiaprep Spin miniprep kit (Qiagen). Для дальнейшего анализа V_H и V_L областей осуществляют расщепление NcoI/NotI (NE Biolabs, Westburg, Leusden, Netherlands) и анализируют на агарозном геле.

Секвенирование (2F2, 7D8 и 11B8).

V -области секвенируют после клонирования в pGBMT-векторную систему II. Секвенирование осуществляют на Baseclear (Leiden, Netherlands). Последовательности анализируют, выравнивая последовательности V -гена зародышевой линии на Vbase (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm). <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901>.

Полученные последовательности показаны на фиг. 53-58.

Пример 3. Рекомбинантное получение 2F2 и 11B8 в линии клеток GS-NS/0.

2F2T.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела 2P2 амплифицируют методом ПЦР с применением стандартного клонирующего вектора pGem-5Zf (Promega), используя праймеры, включающие оптимальную последовательность Козака и подходящие сайты рестрикции для клонирования фрагментов в векторы pCON γ 1 и PCON κ (Lonza) GS константной области.

После амплификации фрагменты очищают и расщепляют рестриктазами для клонирования и лигируют в два вектора. Фрагмент вариабельной области тяжелой цепи расщепляют с помощью Hind III и Bsi WI, лигируют в вектор pCON γ 1, который расщепляют с помощью Hind III и Bsi WI, и дефосфорилируют щелочной фосфатазой. Вариабельный фрагмент легкой цепи расщепляют с помощью Hind III и Apa I и лигируют в вектор PCON κ ; который расщепляют с помощью Hind III и Apa I, и дефосфорилируют щелочной фосфатазой. Векторы pCON γ 1f/вариабельный домен тяжелой цепи и PCON κ /вариабельный домен легкой цепи показаны на фиг. 1 и 2 соответственно. Трансформированные колонии *E. coli* проверяют ПЦР колоний 2, позитивные колонии каждой конструкции тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) выращивают с целью изоляции плазмиды. Выделенную плазмиду этих 4 клонов секвенируют для подтверждения последовательности. Найдено, что оба HC клона и один LC клон имеют корректные последовательности.

Две HC конструкции и одну LC конструкцию объединяют, получают две комбинации LC-HC и транзитивно трансфецируют в CHO-K1 клетках для проверки конструкций на соответствующую продукцию 2P2 антитела. Нормальные уровни продукции достигаются для всех комбинаций в этом эксперименте по экспрессии, и 1 клон каждой из HC и LC конструкций выбирают для конструкции двойного генного вектора.

Объединение HC и LC в двойной генный клонирующий вектор, обозначенный pCON γ 1f/к 2F2, осуществляют лигированием полной кассеты экспрессии из вектора тяжелой цепи, pCON γ 1f/вариабельный домен тяжелой цепи, в вектор легкой цепи, PCON κ /вариабельный домен легкой цепи. Вектор pCON γ 1f/к 2F2 показан на фиг. 3.

11B8T.

Аналогичным образом установлена линия клеток GS-NS/0 для рекомбинантной продукции 11B8 (обозначенной 11B8T) с небольшой модификацией методики, приведенной ниже.

Осуществляют четыре трансфекции NS/0 клеток-хозяев электропорацией с помощью плазмидной ДНК, используя ДНК линейной плазмиды. После изучения полученных колоний под микроскопом для подтверждения того, что колонии имеют подходящий размер для анализа (покрывают более 60% дна

лунки) и что в каждой лунке имеется только одна колония, клеточные супернатанты от 596 трансфектантов подвергают скринингу на "собранный" антитело с помощью IgG, κ-ELISA. Используя эти данные, отбирают 100 трансфектантов для развития и дальнейшей оценки в статической культуре. Культуры выбранных клеточных линий выращивают и адаптируют к среде с низким содержанием сыворотки (среде, содержащей альбумин бычьей сыворотки (BSA) с добавлением 1% dFCS) и осуществляют дополнительную оценку продуктивности в статической культуре (ELISA и определение процентного содержания монослоя). Для развития (выращивания) выбирают 60 клеточных линий с наивысшим ранжированием, и дополнительные 13 клеточных линий, данные о продуктивности которых не получены, также взяты для продолжения исследования (выращивания). Предварительную оценку продуктивности выбранных клеточных линий проводят в суспензионной культуре, помещенной в периодически встряхиваемую колбу в среде с низким содержанием сыворотки (среде, содержащей альбумин бычьей сыворотки (BSA) с добавлением 1% dFCS). Исходя из концентрации собираемого антитела (методом ELISA) и приемлемых характеристик роста 10 клеточных линий выбирают для дальнейшей оценки в суспензионных культурах (в среде, содержащей альбумин бычьей сыворотки (BSA) с добавлением 1% dFCS), помещенных во встряхиваемую колбу с периодической подпиткой. Концентрации продукта при сборе определяют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ, HPLC) с протеином А общеизвестными стандартными методами. В результате одну из клеточных линий отбрасывают. Все полученные 9 клеточных линий продуцируют антитело 11B8 (обозначенное "118BT") с хорошими выходами в интервале 354-771 мг/л по определению методом протеин А ВЭЖХ.

Пример 4. Сравнение антитела 2F2 гибридомы и рекомбинантного антитела 2F2Т трансфектомы.

С помощью гель-электрофореза (SDS-PAGE и нативного (обычного) электрофореза в агарозном геле) показано, что 2F2 и 2F2Т имеют один размер и лишь немного различающийся электрический заряд.

Кроме того, 2F2 и 2F2Т связываются с трансфицированными при использовании CD20 клетками NS/0 и клетками Райи с аналогичной аффинностью, что показано методом проточной цитометрии с применением FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Никакого связывания с нетрансфицированными клетками NS/0 не наблюдается, что демонстрирует специфичность 2F2 и 2F2Т. 2F2 и 2F2Т также индуцируют CDC в зависимости от концентрации в той же степени, что и в клетках ARH-77 (IgG типа лейкоза плазматических клеток), клетках Дауди, клетках ДОНН (рефракторной иммунобластной В-клеточной лимфомы, выращенных из клеток фолликулярной центробластной/центролитической (centrolytic) лимфомы, DSMZ, Braunschweig, Germany), клетках Райи, по измерению лизиса клеток (число PI-позитивных клеток) методом проточной цитометрии (FACScalibur). Во втором эксперименте концентрации 2F2 и 2F2Т остаются постоянными, в то время как добавляют различные концентрации сыворотки. Никаких заметных различий между 2F2 и 2F2Т не наблюдается.

Наконец, 2F2 и 2F2Т, связанные с ассоциированным с клетками CD20, образуют прочную и одинаковую по прочности связь с фактором комплемента C1q. Эксперимент проводят на клетках Дауди, клетках ДОНН и клетках Райи с использованием поликлональных антител против C1q для детектирования связывания с C1q.

Пример 5. Характеристики связывания человеческих антител против CD20.

Связывание с различными линиями клеток.

Клетки NS/0, NS/0, трансфицированные человеческим CD20, клетки Дауди и Райи инкубируют в течение 30 мин при 4°C с культуральным супернатантом, содержащим человеческие антитела 2F2, 7D8 и 11B8, с последующей инкубацией с FITC-конъюгированными Ab против человеческого IgG. Связывание оценивают проточной цитометрией на проточном цитометре FACScalibur. Интенсивности флуоресценции сравнивают с образцами с негативным контрольным изотипом. Как показано на фиг. 4, все три антитела связываются с NS/0 клетками, трансфицированными при использовании человеческого CD20, тогда как в родительских нетрансфицированных NS/0 клетках никакого связывания не наблюдается. Все три антитела также связываются с двумя различными линиями В-клеток (Райи (Raji) и Дауди (Daudi)), это показывает, что антитела 2F2, 7D8, и 11B8 являются специфическими в отношении CD20. Супернатанты, содержащие 7D8 или 11B8, анализируют в условиях ненасыщенности, следовательно, наблюдается более низкая интенсивность по сравнению с 2F2.

Значение EC_{50} антитела 2F2, определяемое проточной цитометрией.

Для определения средней (кажущейся) аффинности 2F2 в отношении CD20, экспрессированного на человеческих В-клетках, строят кривую связывания 2F2 с использованием выделенных РВМС (мононуклеаров периферической крови) от трех человек-доноров и селекции пропускания CD3 негативных клеток. Выделенные РВМС инкубируют в течение 1 ч с FITC, меченными 2F2, в интервале концентраций и анализируют на FACS, определяя среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI). Значения MFI показаны на фиг. 5А и 5В как функция концентрации антитела. Значения EC_{50} рассчитывают методом нелинейной регрессии, используя Graph Pad Prism 3.02. Значение EC_{50} 2F2 для человека аналогично для всех трех доноров, среднее значение (\pm s.e.m. (стандартная ошибка)) 287 ± 12.7 нг/мл (1.9 ± 0.1 нМ).

Связывание меченых 125 I mAbs с клетками, экспрессирующими CD20.

mAbs (моноклональные антитела) йодируют с помощью гранул (кристаллов) йода (Pierce Chemical

Со., Rockford, IL). Меченные ^{125}I mAbs серийно разводят и инкубируют с Ramos-EHRB (клетки на 2 ч при 37°C в присутствии азида натрия и 2-дезоксиглюкозы для предупреждения эндоцитоза. Связанные с клетками и свободные меченные ^{125}I mAbs затем разделяют центрифугированием при $14,000\times\text{g}$ в течение 2 мин с помощью смеси "фталатных масел" (пластификаторов), дающих быстрое разделение, не нарушая равновесное связывание. Выпавший клеточный осадок (пеллеты) вместе со связанным антителом считают гамма-счетчиком (Wallac UK Ltd, Milton Keynes, UK).

Как показано на фиг. 6, 2F2 и 11B8 имеют аналогичные значения K_D (или аналогичные точки насыщения), это указывает, что оба антитела связываются со сходной аффинностью. Однако уровень насыщения антитела 11B8 ниже, чем уровень насыщения 2F2, это показывает, что 11B8 распознает другую форму CD20. Это также находится в соответствии с другим экспериментом, показывающим, что аналогичное число молекул антител 2F2 и ритуксимаба связывается с CD20 на клетках Ramos-EHRB и клетках Дауди, это показывают аналогичные уровни насыщения связывания (примерно $2-3\times 10^5$ молекул антитела на клетку). 11B8 и B1, напротив, насыщают при половине этого уровня, и только около $1-2\times 10^5$ молекул антитела связывается с клетками Ramos-EHRB (фиг. 7A) и клетками Дауди (фиг. 7B).

Чтобы исключить возможность того, что йодированные антитела связываются через Fc-рецепторы, подтверждают кривые связывания, используя F(ab')_2 фрагменты антител против CD20. И снова аналогичные количества 2F2 и ритуксимаб- F(ab')_2 фрагментов связываются как с клетками Ramos-EHRB, так и с клетками Дауди. Также в этих экспериментах число молекул антител 2F2 или ритуксимаба, связывающегося с клетками Ramos-EHRB и Дауди, насыщает примерно при вдвое большем числе, чем число молекул 11B8 и B1, связанных с клетками.

Скорость диссоциации.

Для определения скорости диссоциации mAbs клетки Ramos-EHRB (конечный объем 1 мл в присутствии азида/2DOG) инкубируют в течение 2 ч при 37°C с 2 мкг/мл ^{125}I mAbs до достижения максимального связывания. После центрифугирования на микрофуге (2000 об/мин в течение 2 мин) супернатант удаляют, клеточный осадок (пеллеты) сразу же переносят в 9 мл среды при 37°C в коническую пробирку на 15 мл. В различные временные точки в течение последующих 2 ч отбирают образцы по 0.4 мл и разделяют на "фталатных маслах" для определения уровня меченных радиоактивными метками mAbs, остающихся на клеточной поверхности. Как показано на фиг. 8, как 2F2, так и 11B8 диссоциируют значительно медленнее из ассоциата с CD20, чем ритуксимаб или B1.

Скорости диссоциации анти-CD20 F(ab)_2 фрагментов.

Клетки Ramos-EHRB насыщают, используя 2 мкг/мл меченных ^{125}I F(ab)_2 фрагментов антител 2F2, 11B8 и ритуксимаба соответственно. Клетки Ramos-EHRB отмывают и инкубируют в присутствии высокой концентрации немеченого антитела. Максимальное (начальное) связывание с клетками Ramos-EHRB устанавливают 100%. В различные временные точки в течение 3 ч после лодинга (нагрузки, нанесения) отбирают образцы по 0.4 мл и разделяют на "фталатном масле" для определения уровней меченных радиоактивными метками mAbs, остающихся на клеточной поверхности. Как можно видеть на фиг. 9, 2F2 и 11B8 диссоциируют с поверхности CD20 значительно более медленно, чем ритуксимаб. Через 90 мин примерно 50% молекул F(ab)_2 ритуксимаба связываются с клеткой, тогда как половина молекул 2F2 F(ab)_2 диссоциирует через 3 ч. Значения k_d (k_{off}) для 2F2, 11B8 и ритуксимаба вычисляют следующим образом:

$$\text{F(ab)}_2 \text{ 2F2: } k_d = \ln 2/t_{1/2} (\text{сек}) = \ln 2/10800 (\text{сек}) = 6.4 \times 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$$

$$\text{F(ab)}_2 \text{ 11B8T: } k_d = \ln 2/t_{1/2} (\text{сек}) = \ln 2/9000 (\text{сек}) = 7.7 \times 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$$

$$\text{F(ab)}_2 \text{ ритуксимаб: } k_d = \ln 2/t_{1/2} (\text{сек}) = \ln 2/5400 (\text{сек}) = 1.3 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$$

Функциональные "off" (диссоциации) скорости антител mAb против CD20.

Влияние медленной диссоциации 2F2 по сравнению с ритуксимабом оценивают с помощью функционального CDC анализа. С этой целью клетки Дауди или SU-DHL4 преинкубируют с 10 мкг/мл mAb против CD20 или изотипного контрольного антитела, отмывают и инкубируют в среде различное время. В эти временные точки после начала анализа образцы инкубируют с комплементом (нормальная человеческая сыворотка 20 об.%), а затем инкубируют еще в течение 45 мин при 37°C . После этого определяют лизис клеток на FACS, используя метод окрашивания PI (пропидий йодидом). % лизированных клеток (PI-позитивные клетки) показан на фиг. 10A (клетки Дауди) или на фиг. 10B (клетки SU-DHL4) как функция времени инкубации. 2F2 индуцирует высокую CDC в обоих типах клеток и все еще лизирует до 90% клеток через 6 ч, это указывает, что CD20 насыщение клеток остается достаточно высоким для того, чтобы индуцировать опосредованный комплементом лизис большинства клеток. Напротив, ритуксимаб в соответствии с указанной выше скоростью диссоциации быстро диссоциирует из ассоциата с клеткой и не может индуцировать специфический лизис после 6-часовой инкубации. Антитело 11B8 используют в качестве контроля и оно не индуцирует CDC.

Пример 6. CDC человеческих антител против CD20.

Приготовление сыворотки.

Сыворотку для комплементзависимого лизиса готовят, помещая кровь здоровых добровольцев в "autoser" (для ауторазделения) гель в пробирки вакутейнеры для активатора свертывания крови (BD biosciences, Rutherford, NJ), которые выдерживают при комнатной температуре в течение 30-60 мин, а затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин. Сыворотку собирают и хранят при -80°C.

Проточная цитометрия.

Для проточной цитометрии применяют проточный цитометр FACScalibur с программным обеспечением CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA). По меньшей мере 5000 событий собирают для анализа, при этом клеточный дебрис исключают, корректируя границу переднего и бокового рассеяния света (FCS-forward sideward scatter).

Кинетика CDC.

В первой серии экспериментов (n=3) определяют кинетику CDC различных линий В-клеток, а именно Дауди, SU-DHL4, Райи, ДОНН и ARH-77, добавляя 10 мкг/мл 2F2, ритуксимаба и IgG контрольного антитела соответственно за 10 мин перед прибавлением человеческой сыворотки. Через различные временные интервалы (вплоть до 1 ч) после индукции CDC клетки суспендируют в растворе PI и клеточный лизис (число PI-позитивных клеток) измеряют проточной цитометрией. Результаты изображены на фиг. 11А (ARH-77 клетки), 11В (клетки Дауди), 11С (клетки Райи), 11D (ДОНН) и 11Е (SU-DHL4). Как можно видеть, добавление антител вызывает лизис клеток в течение 5 мин. Интересно отметить, что добавление 2F2 вызывает заметный - более 80% - лизис клеток во всех пяти В-клеточных линиях. Ритуксимаб вызывает более чем 80% клеточный лизис только в клеточных линиях SU-DHL4 и Дауди, тогда как клеточный лизис в линии клеток ДОНН составляет ~50%, а в клеточных линиях ARH-77 и Райи - менее 20%. Лизис совсем не наблюдается в присутствии IgG контрольного антитела (данные только показаны на фиг. 11В).

Титрование сыворотки для определения CDC.

В отдельной серии экспериментов (n=5) NHS (нормальную человеческую сыворотку) титруют при двух различных концентрациях антител: 0.5 и 5 мкг/мл. Клетки преинкубируют с 2F2 или ритуксимабом в течение 10 мин перед тем, как добавить NHS в пределах концентраций. Через 45 мин после индукции CDC клетки ресуспендируют в растворе PL, клеточный лизис (число PI-позитивных клеток) измеряют проточной цитометрией. На фиг. 12А-Д показан процент лизированных клеток (PI-позитивных) как функция концентрации NHS. На фиг. 12А показан клеточный лизис клеток Дауди, на фиг. 12В - клеточный лизис клеток АРН-77, на фиг. 12С - клеточный лизис клеток ДОНН и на фиг. 12Д - клеточный лизис клеток Райи. Повышенный лизис клеток наблюдают с повышением концентрации NHS. Добавление 2F2 вызывает максимальный лизис клеток Дауди при наиболее высоких концентрациях NHS и антитела. Ритуксимаб вызывает примерно 50% клеточный лизис клеток Дауди при наиболее высокой концентрации NHS.

В клетках ARH-77 только самая высокая концентрация NHS и 2F2 вызывает примерно 75% клеточный лизис. Более низкие концентрации недостаточны для индуцирования клеточного лизиса клеток ARH-77. Ритуксимаб не способен индуцировать клеточный лизис клеток ARH-77 в этом эксперименте.

2F2 может индуцировать зависимый от концентрации NHS клеточный лизис клеток ДОНН как при высокой, так и при низкой концентрации, тогда как ритуксимаб не может индуцировать лизис в этих условиях.

Наконец, 2F2 индуцирует зависимый от концентрации NHS клеточный лизис клеток Райи, который можно наблюдать только при концентрации mAb 5 мкг/мл. Никакого лизиса не наблюдается в случае ритуксимаба.

В этих экспериментах не наблюдается лизис в случае изотипического контрольного антитела.

Титрование антител для определения CDC.

Для измерения способности антител против CD20 индуцировать CDC при низких концентрациях проводят эксперимент, в котором титруют антитела (n=6). Различные линии клеток преинкубируют соответственно в присутствии 2F2 и ритуксимаба в интервале концентраций в течение 10 мин перед добавлением NHS. После 45-минутной инкубации при 37°C (когда достигается максимальный лизис) клетки ресуспендируют в растворе PI и клеточный лизис (число PI-позитивных клеток) измеряют проточной цитометрией. На фиг. 13А (клетки Дауди), 13В (клетки ДОНН), 13С (клетки ARH-77) и 13Д (клетки Райи) показано выраженное в процентах число лизированных (PI-позитивных) клеток как функция концентрации антитела. Как 2F2, так и ритуксимаб вызывают зависимое от концентрации повышение клеточного лизиса. 2F2 индуцируют более чем 80% лизис клеток Дауди при добавлении 2 мкг/мл, в то время как в случае ритуксимаба этот уровень не достигается даже после прибавления 10 мкг/мл. Помимо этого, 2F2 индуцирует более чем 80% лизис клеток ДОНН при концентрации 0.4 мкг/мл, тогда как в случае ритуксимаба при этой концентрации наблюдается минимальный лизис. Максимальный лизис клеток ДОНН ритуксимабом (~30% от общего числа анализированных клеток) достигается при концентрации 10 мкг/мл. Индукция лизиса клеток ARH-77 и клеток Райи при использовании 2F2 ниже, но при концентрации антитела 10 мкг/мл все еще достигается ~70% лизис. При этой, наиболее высокой, концентрации

ритуксимаб индуцирует лизис клеток ARH-77 только на ~23%, а клеток Райи только на ~6%.

В аналогичном эксперименте изучают способность 2F2, 2F2Т, 11В8Т и ритуксимаба индуцировать CDC линий клеток Дауди и Райи, см. фиг. 14А и 14В. В этом эксперименте также наблюдается более чем 80%-ный лизис клеток Дауди при использовании (полученных из трансфектомы) антител 2F2Т при концентрации 10 мкг/мл, тогда как в случае ритуксимаба даже при концентрации 10 мкг/мл достигается только 60%-ный уровень лизиса, ср. фиг. 14А. Лизис клеток Дауди при использовании 2F2Т идентичен лизису, наблюдаемому в случае 2F2 гибридомы.

Лизис клеток Райи проходит более трудно, но опять же, как в случае 2F2, так и в случае 2F2Т степень индукции лизиса аналогична (фиг. 14В). Ритуксимаб не способен индуцировать CDC клеток Райи, что согласуется с экспериментом, проиллюстрированным на фиг. 13D.

Как показано на фиг. 14А и 14В, ни клетки Дауди, ни клетки Райи не чувствительны к CDC, вызываемой с помощью 11В8Т. Антитело В1 индуцирует лизис клеток Дауди, но только в малой степени, и не способно индуцировать лизис клеток Райи.

CDC активность антител против CD20 в клетках Дауди.

Для определения CDC активности каждого антитела методом FACS оценивают повышенную проницаемость мембран клеток, окрашенных йодидом пропидия (PI). Коротко говоря, клетки Дауди отмывают и ресуспендируют в питательной среде RPMI/1% BSA при плотности 1×10^6 клеток/мл. К клеткам Дауди прибавляют различные концентрации человеческих моноклональных антител и оставляют связываться с CD20 на клетках в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Затем в качестве источника комплемента прибавляют сыворотку до конечной концентрации 20 об.% и смесь инкубируют в течение 45 мин при 37°C. До анализа клетки хранят при 4°C. Затем каждый образец (150 мкл) добавляют к 10 мл раствора PI (10 мкг/мл в PBS) в пробирке FACS. Смесь сразу же анализируют проточной цитометрией. Как показано на фиг. 15А, антитела 2F2 и 7D8 проявляют более высокую CDC активность по сравнению с ритуксимабом.

Во втором эксперименте клетки метят человеческими моноклональными антителами, как указано выше, затем отмывают и инкубируют в PBS в течение 45 мин при 37°C перед добавлением человеческой сыворотки. Это гарантирует, что только антитело, связанное с клеткой во время добавления сыворотки, способно активировать комплемент для клеточного лизиса. Как показано на фиг. 15В, в случае ритуксимаба наблюдается пониженная CDC активность по сравнению с 2F2 и 7D8, это указывает, что на человеческие антитела (2F2 и 7D8) не влияет отмывание клеток перед добавлением сыворотки.

CDC активность антител против CD20 в клетках Райи.

CDC активность анализируют, используя клетки Райи, которые имеют сравнительно высокую поверхность экспрессии CD55 и CD59 и, следовательно, более устойчивы к атаке комплемента. Человеческие антитела прибавляют к клеткам Райи и оставляют связываться в течение 15 мин. Добавляют человеческую сыворотку (20%) и смеси инкубируют в течение 45 мин при 37°C. Как показано на фиг. 16А, ритуксимаб неэффективно опосредует CDC клеток Райи, тогда как в клетках Райи, опсонизированных при использовании 2F2 и 7D8, наблюдаются значительные уровни клеточного лизиса. Следовательно, 2F2 и 7D8 обладают уникальной способностью лизировать CD55/59 позитивные клетки-мишени.

В отдельном эксперименте клетки Райи преинкубируют с концентрациями насыщения mAb против CD55 (конечная концентрация 5 мкг/мл) и mAb против CD59 (конечная концентрация 5 мкг/мл), чтобы заблокировать действие этих молекул защиты комплемента. Затем прибавляют человеческие антитела против CD20 вместе с сывороткой (20%), как описано выше, на 45 мин при 37°C. Как показано на фиг. 16В, блокада молекул CD55 и CD59 вызывает почти 100%-ный лизис клеток Райи человеческими антителами 2F2 и 7D8, тогда как при применении ритуксимаба наблюдается только 25%-ное увеличение клеточного лизиса.

Роль ингибиторов комплемента I - экспрессия молекул поверхности.

Так как ингибиторы комплемента, такие как CD55 и CD59, по-видимому, играют важную роль в чувствительности к вызванной ритуксимабом CDC, проводят эксперимент для определения экспрессии этих молекул на исследуемых линиях В-клеток (Райи, Дауди, ДОНН, ARH-77 и SU-DHL4).

Клетки окрашивают FITC-конъюгированными антителами против CD55, CD59 и CD20 и экспрессию молекул анализируют проточной цитометрией. Результаты показаны в приведенной ниже табл. 1.

Экспрессия	CD20	CD55	CD59
ARH- 77	++	++++	++
Райи	+	++	+++
ДОНН	++	+++	++
SU- DHL4	+++	+	++
Дауди	++	+	+

Роль ингибиторов комплемента II - блокада CD55 и CD59.

Для дополнительного изучения роли CD55 и CD59 в CDC, индуцированной против CD20, перед

индукцией CDC обе молекулы ингибиторов комплемента блокируют специфическими антителами (n=3). Используют клетки Райи, так как один 2F2 вызывает лишь частичный лизис. Клетки Райи (1×10^5 клеток/50 мкл) преинкубируют с 2F2 и ритуксимабом в интервале концентраций вместе с антителами против CD55 (95 мкг/мл) и CD59 (5 мкг/мл) в течение 10 мин перед тем как добавить пул NHS (20%). Через 45 мин после индукции CDC клетки ресуспендируют в растворе PL, клеточный лизис (число PI-позитивных клеток) измеряют проточной цитометрией. На фиг. 17A-C показано количество лизированных (PI-позитивных) клеток в процентах как функция концентрации антитела и показан один эксперимент, который является примером трех экспериментов. На фиг. 17A показана инкубация клеток Райи с антителом против CD55, на фиг. 17B показана инкубация клеток Райи с антителом против CD59 и на фиг. 17C показана инкубация клеток Райи с антителами против CD55 и CD59.

Как видно на фиг. 17A, добавление антитела против CD55 не влияет на CDC, индуцированную 2F2 или ритуксимабом. Добавление антитела против CD59 повышает чувствительность клеток как к 2F2, так и ритуксимабу примерно на 30% (фиг. 17B). Добавление антител как против CD55, так и против CD59 дополнительно повышает лизис клеток, вызванный антителами против CD20, примерно на 30% (фиг. 17C).

Роль факторов комплемента, определяемая проточной цитометрией I - C1q связывание.

Антитела против CD20 (2F2 и ритуксимаб) и изотипическое контрольное антитело добавляют к различным В-клеточным линиям. Инкубируют 10 мин и прибавляют NHS (1 об.%). Инкубируют еще в течение 10 мин при 37°C и клетки отмывают, супернатант отбрасывают и клеточный осадок (пеллеты) инкубируют с конъюгированным с FITC антителом против C1q. Данные средней интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных с помощью C1q, показаны на фиг. 18A (Дауди), 18B (ARH-77), 18C (ДОНН) и 18D (Райи) (n=6). Результаты указывают на зависящее от концентрации антитела повышение связывания C1q антителом 2F2 вне зависимости от исследуемой В-клеточной линии. Кроме того, связывание C1q антителом 2F2 всегда выше, чем связывание ритуксимабом во всех изученных линиях клеток. В случае изотипического контрольного антитела не наблюдается никакого увеличения среднего значения флуоресценции (данные не показаны).

Роль факторов комплемента, определяемая проточной цитометрией II - активация комплемента по классическому пути.

Фиксация C4c на клетках с пленкой из антител есть показатель активации комплемента по классическому пути. Антитела против CD20 (2F2 и ритуксимаб) и изотипическое контрольное антитело добавляют к различным линиям В-клеток. Инкубируют при 37°C в течение 10 мин, прибавляют NHS (1 об.%). После дополнительной инкубации и отмывания клеток отбрасывают супернатант и клеточный осадок инкубируют с FITC-конъюгированным антителом против C4c. Данные средней интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных с помощью C4c, показаны на фиг. 19A (Дауди), 19B (ARH-77), 18C (ДОНН) и 18D (Райи) (n=6). Фиксация фактора комплемента C4c на 2F2 продемонстрирована во всех тестируемых В-клеточных линиях (n=3), при этом максимум достигается при концентрации антитела ~1 мкг/мл. Фиксация C4c после связывания с 2F2 значительно выше, чем в случае ритуксимаба, вне зависимости от тестируемой клеточной линии. В случае изотипического контрольного антитела не наблюдается никакого увеличения среднего значения флуоресценции (данные не показаны).

CDC в термоинактивированной сыворотке.

Клетки (клетки Дауди, клетки ARH-77 или клетки Райи) и антитела (ритуксимаб, 2F2, 2F2T, 11B8 и изотипическое контрольное антитело NuMab-KLH IgG1) преинкубируют в пределах концентраций антител против CD20 в течение 10 мин, после чего добавляют NHS (активную или термоинактивированную на водяной бане при 57°C в течение 30 мин). Через 45 мин после индукции CDC клетки ресуспендируют в растворе PI. Клеточный лизис (число PI-позитивных клеток) определяют проточной цитометрией. В присутствии термоинактивированной сыворотки, вне зависимости от клеточной линии и используемого антитела к CD20, не наблюдается никакого лизиса клеток, в присутствии термоинактивированной сыворотки не наблюдается CDC.

Пример 7. ADCC человеческих антител против CD20 ADCC анализ I.

Обогащение человеческих нейтрофилов.

Полиморфонуклеарные клетки (нейтрофилы, PMN) обогащают из гепаринизированной цельной крови. Кровь дважды разводят в RPMI 1640 и наносят слоями на Ficoll (Lymphocyte Separation Medium (среда для разделения лимфоцитов), 1077 г/мл, 710 г, RT (комнатная температура), 20 мин; BioWhittaker, cat. 17-829E, lot no. 014832) и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Слой мононуклеаров удаляют и эритроциты в осадке (пеллетах), содержащем нейтрофилы, лизируют в гипотоническом растворе, используя охлажденный льдом раствор NH_4Cl (155 мМ NH_4Cl , 10 мМ NaHCO_3 , 0.1 мМ EDTA, pH 7.4). Оставшиеся нейтрофилы дважды отмывают и ресуспендируют в среде RPMI 1640, дополненной 10% FCS (RPMI-10).

Обогащение мононуклеаров человеческой периферической крови.

Человеческую кровь дважды разводят в среде RPMI 1640 и клетки крови наносят слоями на Ficoll (Lymphocyte Separation Medium (среда для разделения лимфоцитов) 1077 г/мл, 710 г, RT (комнатная температура), 20 мин; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Venders, Verviers, Belgium, cat. 17-829E, lot no.

014832). Мононуклеары периферической крови (MNC) собирают из интерфазы, отмывают и ресуспендируют в культуральной среде RPMI 1640, дополненной 10% FCS, 2 mM L-глутамина, 5 Ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (все от BioWhittaker), к которой добавлено 25 mM HEPES (BioWhittaker).

Проведение анализа ADCC.

В-клетки-мишени (свежевыделенные В-клетки или линии В-клеток) метят с помощью 20 мкКи ^{51}Cr (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) в течение 2 ч. После интенсивного отмывания в среде RPMI-10 концентрацию клеток доводят до 1×10^5 клеток/мл. Цельную кровь, или изолированные эффекторнe клетки (50 мкл; MNC, PMN), или плазму (50 мкл), сенсибилизирующие антитела (50 мкл) и RPMI-10 (50 мкл) помещают в круглодонные микротитрационные плашки (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Анализы начинают, добавляя клетки-мишени (50 мкл), получают конечный объем 200 мкл. В случае выделенных эффекторных клеток используют соотношение эффектора к мишени (Е:Т) 40:1. Для цельной крови используют количество 33 об.%, соответствующее установленному соотношению эффектора к мишени 40:1. После инкубации (3 ч, 37°C) анализ прекращают центрифугированием и сцинтилляционным счетчиком в тройном повторе измеряют высвобождение ^{51}Cr числом импульсов в 1 мин (срм). Клеточную цитотоксичность в процентах высчитывают по следующей формуле:

$$\text{специфический лизис \%} = (\text{экспериментальное срм} - \text{базисное срм}) /$$

$$(\text{максимальное срм} - \text{базисное срм}) \times 100$$

максимальное высвобождение (выделение) ^{51}Cr измеряют, добавляя перхлорную кислоту (конечная концентрация 3%) к клеткам-мишеням, а базисное выделение измеряют в отсутствие сенсибилизирующих антител и эффекторных клеток.

Статистика.

Данные анализируют односторонним дисперсионным анализом ANOVA с последующим тестом Тьюки для множественных post-hoc сравнений. Анализ осуществляют с помощью Graph Pad Prism (версия 3.02 для Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Лизис клеток ARH-77.

В первой серии экспериментов в качестве клеток-мишеней используют клетки ARH-77 (фиг. 20). Добавление 2F2 (n=3), ритуксимаба (n=3) или 11B8T (n=1) вызывает опосредованный MNC, примерно 50%-ный лизис клеток ARH-77. Специфический лизис не наблюдается в присутствии нейтрофилов. Добавление плазмы (для оценки роли комплемента) вызывает лизис клеток ARH-77 после инкубации с 2F2, но не после инкубации с ритуксимабом (p<0.05, сравнение данных в присутствии 2F2 (vs.) и в отсутствие антитела, ANOVA) или 11B8T. В присутствии цельной крови лизис клеток ARH-77 повышается после инкубации с 2F2 (p<0.05, 2F2 vs. ритуксимаб и 2F2 vs. отсутствие антитела, ANOVA), но не с ритуксимабом. Специфический лизис, вызванный ритуксимабом, на самом деле очень низок в присутствии цельной крови. 11B8T вызывает клеточный лизис с уровнем примерно 25% (n=1) в присутствии цельной крови. В отсутствие антитела наблюдается 10-15%-ный неспецифический лизис.

Лизис клеток В-CLL.

Во второй серии экспериментов клетки хронического В-лимфоцитарного лейкоза (В-CLL), полученные от В-CLL пациентов (n=12), субклонировать в течение 5 циклов, а затем используют в качестве клеток-мишеней в эксперименте (фиг. 21). В отсутствие антитела специфический лизис не наблюдается, но добавление 2F2, 11B8T или ритуксимаба (10 мкг/мл) повышает уровень опосредованного MNC специфического лизиса до 10-20% (p<0.001, ANOVA). Инкубация клеток-мишеней с плазмой и 2F2 индуцирует специфический лизис клеток В-CLL, тогда как никакого специфического лизиса не наблюдается с 11B8T или ритуксимабом (p<0.001, ANOVA). Помимо этого, 2F2 опосредует специфический лизис клеток В-CLL после инкубации с цельной кровью. Никакого специфического лизиса клеток В-CLL цельной кровью не наблюдается с 11B8T (p<0.01, ANOVA) или ритуксимабом (p<0.001, ANOVA). Никакого специфического лизиса не наблюдается в присутствии нейтрофилов.

Так как ритуксимаб способен опосредовать эффективную ADCC, но не CDC (цитотоксичность) тестируемых опухолевых клеток, то, по-видимому, индуцированный цельной кровью лизис В-клеток при использовании 2F2 опосредуется комплементом.

Лизис клеток волосатоклеточного лейкоза (HCL).

В третьей серии экспериментов определяют лизис клеток HCL при использовании 2F2, 11B8T и ритуксимаба с помощью ADCC или в присутствии плазмы или цельной крови. Данные показаны на фиг. 22. В то время как нейтрофилы не могут опосредовать ADCC вне зависимости от применяемого mAb, 11B8T может индуцировать MNC-опосредованный лизис HCL клеток более эффективно, чем 2F2 (p<0.001, ANOVA) или ритуксимаб (p<0.05, ANOVA). 2F2 и ритуксимаб не могут индуцировать MNC-опосредованный лизис HCL клеток. Опосредованный плазмой лизис клеток значительно повышается при использовании 2F2 по сравнению с ритуксимабом (p<0.05, ANOVA), 11B8T (p<0.01, ANOVA) или в сравнении с отсутствием антитела (p<0.001, ANOVA). При изучении лизиса, индуцированного антителом против CD20 в присутствии цельной крови, 2F2 индуцирует полный лизис клеток и уровень его выше, чем в присутствии ритуксимаба (p<0.01, ANOVA), 11B8T или в отсутствие антитела (p<0.001, ANOVA).

Лизис клеток В-ALL.

На клетках двух пациентов изучена способность 2F2 и ритуксимаба индуцировать лизис В-ALL клеток с помощью ADCC или комплемента (фиг. 23). Как наблюдалось в предыдущих экспериментах, 2F2 и ритуксимаб индуцирует MNC-опосредованную ADCC клеток В-ALL в одинаковой степени. Но опять же, 2F2 способен индуцировать лизис В-ALL клеток, опосредованный плазмой или цельной кровью, тогда как ритуксимаб не способен.

Лизис клеток фолликулярной лимфомы.

При исследовании лизиса фолликулярной лимфомы (n=2) наблюдается другая картина (фиг. 24). Наблюдается минорный PMN-опосредованный лизис 2F2, и как 2F2, так и ритуксимаб не способны индуцировать MNC-опосредованную ADCC. 11B8T еще способен индуцировать MNC-опосредованный лизис примерно на 20%. Хотя ритуксимабом индуцируются относительно высокие уровни опосредованного плазмой лизиса, полный опосредованный плазмой лизис наблюдается с 2F2. Также при использовании цельной крови полный лизис наблюдается с 2F2, тогда как с ритуксимабом уровень лизиса составляет 70%. В случае 11B8T наблюдается минимальный уровень лизиса, опосредованного плазмой или цельной кровью.

Лизис клеток лимфомы клеток мантийной зоны.

Труднее вызвать лизис клеток лимфомы мантийной зоны (n=1, фиг. 25). Минимальный уровень лизиса или отсутствие лизиса при использовании 2F2, 11B8T или ритуксимаба наблюдается после прибавления PMN или MNC и mAbs против CD20. Однако антитело 2F2 еще способно вызвать примерно 40%-ный лизис при использовании плазмы или цельной крови, тогда как в случае ритуксимаба лизируется только 10-20% клеток. 11B8T не способен индуцировать лизис первичных клеток лимфомы мантийных клеток.

Зависимый от концентрации антитела лизис клеток ARH-77 в цельной крови.

В следующем эксперименте (n=4) анализируют зависимость от дозы индукции ADCC на клетках ARH-77 в присутствии цельной крови. Как видно на фиг. 26, титрование 2F2 индуцирует зависимое от дозы повышение выраженного в процентах уровня специфического лизиса (p<0.05: эффект обработок, двусторонний ANOVA) клеток ARH-77. В случае ритуксимаба не наблюдается никакого специфического лизиса клеток ARH-77.

ADCC анализ II.

Приготовление меченных ⁵¹Cr клеток-мишеней.

Клетки ARH-77 и клетки Райи собирают (3×10⁶ клеток) в среде RPMI++, отделяют центрифугированием (1500 об/мин, 5 мин), ресуспендируют в 140 мкл ⁵¹Cr (Хром-51; CJS11-1 мКи, партия 12, 140 мкл примерно эквивалентны 100 мКи) и инкубируют; (37°C водяная баня; 1 ч). Клетки отмывают (1500 об/мин, 5 мин, в PBS, 3×), ресуспендируют в RPMI++ и считают с помощью исключения трипанового синего. Клетки доводят до концентрации 2×10⁶ клеток/мл.

Приготовление эффекторных клеток.

Свежие мононуклеары периферической крови (MNC) выделяют из 40 мл гепаринизированной крови с помощью Ficoll (Bio Whittaker, среда для отделения лимфоцитов, cat 17-829E) по рекомендациям производителя. Клетки ресуспендируют в RPMI++, считают исключением трипанового синего и доводят до концентрации 1×10⁶ клеток/мл.

Определение ADCC.

50 мкл RPMI++ пипеткой вносят в 96-луночные планшеты и добавляют 50 мкл меченных ⁵¹Cr клеток-мишеней. Затем добавляют 50 антитела, разведенного в RPMI++ (конечные концентрации 10, 1, 0.1, 0.01 мкг/мл). Клетки инкубируют (RT, 10 мин) и добавляют 50 мкл эффекторных клеток, получают соотношение эффектора к мишени 50:1 (для определения максимального лизиса вместо эффекторных клеток прибавляют 50 мкл 5% Тритон-Х-100). Клетки отделяют на центрифуге (500 об/мин, 5 мин) и инкубируют (37 °C, 5% CO₂, 4 ч). Клетки центрифугируют (1500 об/мин, 5 мин), 100 мкл супернатанта собирают в микропробирки и считают на гамма-счетчике. Процент специфического лизиса вычисляют следующим образом:

$$\% \text{ специфического лизиса} = \frac{(\text{срм образца} - \text{срм одних клеток- мишеней}) / (\text{срм максимального лизиса} - \text{срм одних клеток- мишеней}) \times 100$$

Статистика.

Данные анализируют односторонним дисперсионным анализом ANOVA с последующим тестом Тьюки для множественных post-hoc сравнений. Анализ осуществляют с помощью Graph Pad Prism (версия 3.02 для Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Зависимый от концентрации антитела лизис клеток ARH-77 и клеток Райи.

2F2T и 11B8T проверяют на способность индуцировать ADCC клеток ARH-77 и клеток Райи (n=3) с ритуксимабом.

Зависимое от дозы отношение mAbs к CD20 наблюдают при ADCC клеток ARH-77 при использовании MNC в качестве эффекторных клеток (фиг. 27). Как 2F2T, так и 11B8T индуцируют специфический лизис клеток ARH-77, максимальный (50%) при концентрации mAb 10 мкг/мл. Ритуксимаб вызыва-

ет только 25%-ный лизис клеток-мишеней. Добавление изотипического контрольного антитела (HuMab-KLH) не индуцирует лизис ADCC. Никакого специфического лизиса не наблюдается без добавления MNC (данные не показаны).

Если в качестве клеток-мишеней используют клетки Райи, наблюдается такая же картина, что и в случае с клетками ARH-77 (фиг. 28). Как 2F2Г, так и 11В8Т индуцируют MNC-опосредованный лизис клеток Райи, хотя при низких концентрациях 2F2Г, по-видимому, более эффективно, чем 11В8Т. Максимальный уровень лизиса, достигаемый в случае 2F2Г и 11В8Т, составляет около 35%. Ритуксимаб индуцирует MNC-опосредованный лизис клеток Райи, хотя только 20% клеток-мишеней чувствительно к ритуксимабу. Добавление изотипического контрольного антитела (HuMab-KLH) не индуцирует лизис ADCC. Никакого специфического лизиса не наблюдается без добавления MNC (данные не показаны).

Пример 8. Анализ FRET и анализ на основе нерастворимости Тритона-Х (Triton-X).

Получение Cy3-и Cy5-конъюгированного mAb для флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET).

Моноклональные антитела непосредственно конъюгируют с бифункциональными NHS-сложноэфирными производными Cy3 и Cy5 (Amersham Biosciences UK Ltd), как описано в рекомендациях производителя. Коротко говоря, mAb диализуют против 0.1 М карбонатно/бикарбонатного буфера (pH 9). Затем краситель растворяют в H₂O, сразу же прибавляют к 1 мг mAb и инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 45 мин. Меченые mAbs отделяют от неконъюгированного красителя гель-хроматографией на колонке PD10-Sephadex G25, уравновешенной в PBS. Молярные соотношения связывания определяют спектрофотометрически от $\epsilon_{552}=150/\text{мМ}/\text{см}$ для Cy3, $\epsilon_{650}=250/\text{мМ}/\text{см}$ для Cy5 и $\epsilon_{280}=170/\text{мМ}/\text{см}$ для белка и в интервале 5-8-кратный избыток красителя: белок.

Анализ FRET.

Клетки Дауди ресуспендируют при концентрации 5×10^6 клеток/мл в PBS/0.1% BSA и к клеточной суспензии прибавляют эквимоллярное количество донорного (Cy3)-конъюгированного и акцепторного (Cy5)-конъюгированного mAb (конечная концентрация 10 мкг/мл). Клетки инкубируют в течение 30 мин в темноте при 4°C или при 37°C. В каждом эксперименте участвуют клетки, меченные конъюгированным с донором или конъюгированным с акцептором mAb в результате преинкубации с 5-кратным молярным избытком неконъюгированного mAb, и клетки, меченные конъюгированным с донором с акцептором mAb в присутствии эквимоллярного количества неконъюгированного mAb. Для оценки ассоциации меченых антигенов проводят измерения методом проточноцитометрического FRET на приборе FAC-Scalibur (BD Biosciences). Интенсивности флуоресценции при 585 нм (FL2) и 650 нм (FL3), в обоих случаях возбуждение при 488 нм, и интенсивности флуоресценции при 661 нм (FL4), возбуждаемой при 635 нм, детектируют и используют для расчета FRET по приведенному ниже уравнению, где A обозначает акцептор (Cy5), а D обозначает донор (Cy3). Для всех полученных значений делают поправку на аутофлуоресценцию по следующей формуле:

$$\text{FRET} = \text{FL3(D,A)} - \text{FL2(D,A)} / a - \text{FL4(D,A)} / b$$

$$\text{где } a = \text{FL2(D)} / \text{FL3(D)} \text{ а } b = \text{FL4(A)} / \text{FL3(A)}$$

Скорректированные параметры получают, используя данные, полученные на клетках, меченных одной меткой, а боковое рассеяние света используют для того, чтобы отсеять клеточный дебрис и мертвые клетки. FRET между донорными и акцепторными mAb производными на клетках, меченных двумя метками, выражают как сенсibilизированную акцептором эмиссию при 488 нм. Более высокие значения FRET указывают на более тесную физическую ассоциацию антител, меченных донором и акцептором, или на более высокую плотность меченного акцептором mAb вблизи от меченного донором mAb.

Оценка антигена, ассоциированного с рафтом, основанная на нерастворимости Тритона-Х-100 (TX).

Для быстрой оценки присутствия антигена в микродоменах рафтов используют метод проточной цитометрии, основанный на нерастворимости Тритона-Х-100 (TX) при низких температурах, описанный ранее. Коротко говоря, клетки Дауди отмывают в RPMI/1%BSA и ресуспендируют при концентрации 2.5×10^6 клеток/мл. Затем клетки (100 мкл) инкубируют с 10 мг/мл mAb, конъюгированными с FITC, в течение 15 мин при 37°C, отмывают в холодном PBS/1%BSA/20 мМ азида натрия (PBS-BS) и образец делят пополам. Во время остального анализа все образцы хранят на льду. Одну половину хранят на льду, что позволило бы рассчитать 100%-ные уровни поверхностных антигенов, в то время как другую половину обрабатывают 0.5% TX в течение 15 мин на льду для определения пропорции антигена, остающегося в нерастворимой рафтовой фракции. Затем клетки хранят при 4°C до конца анализа, отмывают PBS-BS, снова суспендируют в PBS-BS и анализируют проточной цитометрией. Для определения конститутивного уровня ассоциации рафтов с антигенами-мишенями клетки сначала обрабатывают 0.5% TX в течение 25 мин на льду и промывают PBS-BS перед связыванием mAb, меченных FITC.

Как показано на фиг. 29А, 29В и 29, метод флуоресцентного переноса резонансной энергии (FRET) показывает образование кластеров CD20 при инкубации с 2F2 или 7D8. Никакого образования кластеров не обнаруживается при инкубации с 11В8. Эти результаты согласуются с данными обработки TX, ср. фиг. 29С (т.е. 2F2 и 7D8, в отличие от 11В8, после связывания остаются в нерастворимой фракции клеток) и подтверждают концепцию, что 2F2 и 7D8 после связывания переносят (транслоцируют) CD20 в

компаратмент липидного рафта В-клеточной мембраны.

Как показано на фиг. 30 (значения FRET и s.e.m. (стандартной ошибки) из трех экспериментов односторонним дисперсионным анализом ANOVA с последующим тестом Тьюки для множественных *post-hoc* сравнений), FRET анализ указывает на образование кластеров ритуксимаба и 2F2, тогда как в случае 1188T образования кластеров не наблюдается. Эти данные находятся в соответствии с данными, полученными после обработки 0.5%TX перед связыванием mAb, меченных FITC, см. фиг. 31 (n=2).

Получение фракции липидных рафтов и вестерн-блоттинг.

Другим способом изучения ассоциации CD20 с липидными рафтами является исследование распределения CD20 в мембране между фракциями липидных рафтов и участками, не содержащими рафтов, используя метод градиентного фракционирования сахарозы, описанный Deans, J.P., et al., J. Biol. Chem., 1998. 273(1): p. 344-348, с одним изменением: вместо сахарозы берут Optiprep (Sigma). Моноклональные антитела против CD20 (10 мкг/мл) оставляют связываться с клетками Дауди (1×10^7) в течение 20 мин при 37°C. После этой инкубации клетки центрифугируют (пеллетируют), отмывают дважды PBS и лизируют в охлажденном льдом буфере для лизиса (1.0% TX в забуференном MES физиологическом солевом растворе (25 mM MES, pH 6.5, 150 mM NaCl, 1 mM фенилметилсульфонилфторида, 5 мкг/мл апротинина, 5 мкг/мл лейпептина, 10 mM EDTA)). Клеточные пеллеты тщательно ресуспендируют в течение 20 мин на льду. Затем лизат смешивают с 400 мкл холодного препарата 60% Optiprep (Sigma). Образец покрывают слоем 600 мкл каждого разведения Optiprep: 35, 30, 25, 20, 0% в буфере для лизиса. Градиенты центрифугируют при 40.000 об/мин при 4°C в течение 18 ч. Шесть фракций собирают сверху, подвергают электрофорезу на 4-15% SDS-PAGE геле, переносят на нитроцеллюлозные мембраны и инкубируют с первичным антителом (мышинные антитела (поликлональных сывороток) против CD20 (anti-CD20 polysera; Serotec, UK)), а затем с HRP-конъюгированным вторичным антителом (кроличье антитело против мышинового HRP; Jackson, Bar Harbor, Maine, USA). Блоты визуализуют, используя субстрат пролонгированного действия Supersignal West Dura (Pierce, Woburn, MA, USA).

Результаты показаны на фиг. 32. Видно, что присутствие молекул CD20 ограничивается фракцией с высокой плотностью 5 (необработанные клетки). В клетках, обработанных ритуксимабом, наблюдается заметный сдвиг распределения CD20 при значительной доле в мембранных фракциях 2 и 3 с низкой плотностью, соответствующих фракции, в которых, как ожидается, происходит седиментация "рафтовых" участков мембраны. В клетках, обработанных 2F2, также наблюдается этот сдвиг во фракции 2 и 3. Напротив, в случае клеток, в течение 20 мин обработанных 1188T, наблюдается аналогичное распределение, аналогичное распределению в необработанных клетках, с присутствием молекул CD20 во фракции 5. В заключение можно сказать, что связывание с 2F2 и ритуксимабом индуцирует сдвиг молекул CD20 в мембранные фракции с более низкой плотностью, тогда как связывание с 1188T такого сдвига не дает.

Пример 9. Апоптоз клеточных линий Беркитта человеческими антителами против CD20.

Апоптоз.

Клетки Дауди, 0.5×10^6 в 1 мл среды для тканевых культур, помещают в 24-луночные плоскодонные планшеты, содержащие 1 или 10 мкг/мл mAb или контрольных антител, и инкубируют при 37°C. Через 20 ч клетки собирают, отмывают в буфере, связывающем Annexin-V-FITC (BD biosciences), и метят с помощью Annexin-V-FITC (BD biosciences) в течение 15 мин в темноте при 4°C. Клетки хранят при 4°C до анализа. Каждый образец (150 мкл) прибавляют к 10 мкл раствора PI (10 мкг/мл в PBS) в пробирке FACS. Смесь сразу же анализируют проточной цитометрией на проточном цитометре с FACScalibur с помощью программы CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA). Для анализа собирают по меньшей мере 10000 событий.

Индукция апоптоза в клетках Дауди.

Клетки Дауди инкубируют в течение 20 ч в присутствии человеческих антител против CD20 (1 мкг/мл) (без добавления вторичного сшивающего антитела). Индукцию апоптоза анализируют методом проточной цитометрии с окрашиванием с помощью Annexin-V/PI.

Как показано на фиг. 33A-G, в случае 11B8 имеется четкое свидетельство индуцирования апоптоза (аналогично апоптозу, индуцированному антителом против IgM). 2F2 и 7D8 не индуцируют апоптоз клеток Дауди. В качестве контрольного используют AT80, мышинное антитело, индуцирующее апоптоз против CD20.

Индукция апоптоза в клетках Райи.

Индукцию апоптоза клеток Райи анализируют в интервале концентраций mAb против CD20. На фиг. 34 показано процентное содержание позитивных в отношении аннексина-V клеток. Как видно на фиг. 34, позитивное контрольное мышинное mAb против человеческого CD20, B1, индуцирует зависимое от концентрации повышение апоптоза клеток Райи с максимальным значением примерно 70% при 10 мкг/мл mAb. 11B8 также является сильным индуктором апоптоза, вызывая апоптоз клеток Райи с максимумом 53.4% при концентрации mAb 10 мкг/мл. С другой стороны, 2F2 и ритуксимаб в очень слабой степени индуцируют апоптоз клеток Райи: слегка повышенные уровни вызываемого ими апоптоза сравнимы с уровнями негативного контроля.

Индукция апоптоза в клетках Дауди.

Такая же картина наблюдается при добавлении 1.0 мкг/мл mAb против CD20, когда в качестве клеток-мишеней используют клетки Дауди (фиг. 35A и 35B). Данные на фиг. 35 показывают сумму (все количество) клеток, позитивных в отношении аннексина-V, а данные на фиг. 35B (данные на оси X относятся к аннексину-V, а на оси Y к PI) показывают процентное содержание клеток Дауди при раннем апоптозе (клетки, позитивные в отношении аннексина-V и негативные в отношении PI) и при позднем апоптозе (клетки, позитивные в отношении аннексина-V и позитивные в отношении PI). Опять же, как B1 (65.9%), так и 11B8T (56.3%) являются сильными индукторами апоптоза при концентрации 1.0 мкг/мл. Прибавление 2F2T дает низкий уровень апоптотических клеток Дауди (17%). Прибавление ритуксимаба вызывает уровень апоптоза клеток Дауди 29%. Добавление изотипического контрольного антитела HuMab-KLN не индуцирует апоптоз клеток Дауди (6%).

Пример 10. Гомотипическая адгезия клеток с человеческими антителами против CD20.

Гомотипическая адгезия коррелируется с индукцией апоптоза. Поэтому изучают способность mAbs против CD20 индуцировать гомотипическую агрегацию B-клеток.

Гомотипическая агрегация клеток Ramos-EHRB.

Клетки Ramos-EHRB (0.5×10^6 в 1 мл тканевой культуральной среды) инкубируют при 37°C в течение 4 ч в присутствии антител против CD20 11B8, 2F2 или 7D8 (без сшивания) и индукцию гомотипической адгезии изучают методом световой микроскопии (описанной выше).

Как показано на фиг. 36A-E, 11B8 вызывает интенсивную агрегацию клеток Ramos-EHRB (аналогично агрегации, вызванной AT80, мышинным антителом против CD20). 2F2 и 7D8 не индуцируют гомотипическую агрегацию клеток Ramos.

Гомотипическая агрегация клеток Дауди.

Клетки Дауди помещают в 24-луночные плоскодонные планшеты при концентрации 1 или 10 мкг/мл mAb против CD20 или контрольного антитела и инкубируют при 37°C в течение 4 ч. Степень гомотипической агрегации определяют световой микроскопией. Как видно на фиг. 37, 2F2 с трудом индуцирует агрегацию клеток Дауди при концентрации 1.0 мкг/мл (и 10 мкг/мл, данные не показаны). Ритуксимаб вызывает небольшую гомотипическую агрегацию клеток Дауди. Напротив, антитело B1 является сильным индуктором гомотипической агрегации.

Пример 11. Иммуноterapia с применением человеческих антител против CD20.

Терапия высокой дозой (100 мг) 2F2 и 7D8 мышей SCID, которым введены (зараженных клетками) клетки Дауди. Мышей SCID получают от Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK, размножают и хранят в стерильных условиях. Клетки Дауди (2.5×10^6) инъецируют в.в. (внутривенно) в хвостовую вену группам 12-16-недельных мышей SCID, а через 7 дней таким же способом инъецируют 100 мкг 2F2 или 7D8. Показателем поражения животного является паралич конечностей в соответствии с инструкциями комиссии по этике при работе с животными. Как показано на фиг. 38, продолжительность жизни (выживание) мышей увеличивается после обработки с помощью 2F2 или 7D8.

Терапия высокой дозой (100 мкг) 2F2 и ритуксимаба мышей SCID, которым введены (зараженных клетками) клетки Tanoue. Клетки Tanoue (2.5×10^6 в 200 мкл PBS) инъецируют в.в. (внутривенно) в хвостовую вену группам 12-16-недельных мышей SCID (Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK), а через 7 дней таким же способом инъецируют 100 мкг (в 200 мкл PBS) 2F2 или 7D8. В этом эксперименте 2F2 сравнивают с ритуксимабом и B1. Показателем поражения животного является паралич задних конечностей. Результаты показаны на фиг. 39. На 39 день первые две контрольные мыши гибнут, и в этой группе в день 54 гибнут все животные. В группе, принимавшей 2F2, за это время погибла только одна мышь, и в этой группе продолжительность жизни (выживание) других мышей значительно выше. Одна мышь умерла на 81 день после инъекции опухолевых клеток, а остальные мыши (60% от всего количества) живы к концу эксперимента на 100 день после заражения. Напротив, ритуксимаб увеличивает срок жизни только 2 мышей из 5 (смерть на 66 и 83 дни после заражения) и ни одна мышь не доживает до конца эксперимента. В группе B-1 срок жизни (выживание) мышей SCID аналогичен сроку жизни в группе 2F2, в этой группе две мыши гибнут на 48 день, а одна мышь на 76 день. В этой группе сорок процентов мышей живы ко времени окончания эксперимента.

Эффект дозы 2F2 и ритуксимаба при лечении мышей SCID, зараженных клетками Дауди.

С целью оценки эффективности 2F2 для защиты от опухолегенеза по сравнению с ритуксимабом определяют их дозу для терапии мышей SCID, зараженных опухолевыми клетками Дауди. Клетки Дауди экспрессируют больше CD20, чем клетки Tanoue, и более чувствительны к киллингу *in vitro*. 10 группам мышей SCID (по 4 мыши в группе) и 1 контрольной группе (5 мышей SCID) инъецируют 2.5×10^6 клеток Дауди (в 200 мкл PBS) в.в. в день 0, а затем в день 7 внутривенно (в.в.) вводят 20, 5, 2, 0.5 или 0.1 мкг ритуксимаба, 2F2 или PBS (в 200 мкл PBS). Показателем поражения животного является паралич задних конечностей. Результаты показаны на фиг. 40.

В контрольной группе все мыши погибают в дни 26-29. Однако в случае 2F2 наблюдается четкий эффект дозы (соотношение доза-эффект) (фиг. 40, верхний график). В то время как эффект дозы не наблюдается при дозах 0.1 и 0.5 мкг 2F2, доза 2 мкг 2F2 существенно увеличивает срок жизни до 41 дня,

доза 5 мкг 2F2 увеличивает срок жизни до 47 дней и доза 20 мкг 2F2 увеличивает срок жизни до 50 дней.

Напротив, ритуксимаб, даже при испытании в самой высокой дозе 20 мкг, лишь немного повышает срок жизни (выживание) и, следовательно, при более низких концентрациях не наблюдается никакого эффекта дозы (фиг. 40, нижний график).

Терапия мышей SCID с опухолями Дауди с помощью 11B8T и B1.

Клетки Дауди (2.5×10^6) инъецируют в.в. (внутривенно) в хвостовую вену группам 12-16-недельных мышей SCID, а через 7 дней таким же способом инъецируют 100 мкг 11B8T или B1. Показателем поражения животного является паралич нижних конечностей. В группе контрольных мышей, получавших PBS, все мыши гибнут в интервале между днем 35 и днем 53 (фиг. 41). Инъекция 11B8T надежно защищает мышей, при этом мыши погибают между днем 72 и днем 98 после заражения опухолевыми клетками. В группе, инъецированной B1, большинство мышей доживает до дня 98, а 40% мышей живо до окончания эксперимента, т.е. до дня 100.

Пример 12. Оценка антител против CD20 на модели Дауди-1uc ксенотрансплантата у мышей SCID.

Терапевтическую эффективность антител против CD-20 изучают на мышинной модели, в которой распространяют разрастание человеческих опухолевых В-клеток, а затем применяют внешнюю оптическую визуализацию (сцинтиграфию). В этой модели опухолевые клетки трансфецируют с помощью люциферазы светляков. При введении мышам люциферина (Molecular Probes (Молекулярные зонды), Leiden, The Netherlands) меченые клетки можно обнаружить *in vivo* биолуминесцентной визуализацией (сцинтиграфией), используя CCD камеру с высокой чувствительностью, ср. Wetterwald et al. (2002) *American Journal of Pathology*, 160(3): 1143-1153.

Клетки Дауди трансфецируют с помощью gWIZ люциферазы из системы для генной терапии (Gene Therapy Systems (San Diego, CA)) и культивируют в среде RPMI с 10% FCS, Pen/Strep, пирувата натрия и 1 мкг/мл пурамицина (Sigma). Клетки анализируют на экспрессию люциферазы (экспрессируемой в $RLU/1 \times 10^5$ клеток) с помощью люминометра и на экспрессию CD20 с помощью FACS. 2.5×10^6 трансфецированных при участии люциферазы клеток Дауди/мышь инъецируют в.в. мышам SCID. Через восемь дней после инокуляции мышам вводят однократную дозу (10 мкг) 2F2T, 11B8T, ритуксимаба, B1 или изотипического контрольного антитела (huIgG1) (6 мышей в группе обработки). Для проведения визуализации (сцинтиграфии) мышей усыпляют с помощью *i.p.* (интраперитонеальной инъекции) смеси кетамин/кселазин/атропин. Синтетический D-люциферин (натриевая соль, (молекулярные зонды) Molecular Probes) вводят интраперитонеально в дозе 25 мг/мл. Затем мышей помещают в легкий тесный бокс и через 3 мин начинают сцинтиграфию с применением охлаждаемого жидким азотом детектора CCD VersArray 1300B (Roper Scientific). Излучаемые люциферазой фотоны считают в течение периода экспозиции 5 мин. Черные и белые изображения при освещении берутся в качестве стандарта. Для сбора данных и анализа изображения используют программное обеспечение MetaVue software (Universal Imaging Corp.). Статистическую значимость разницы между группами устанавливают методом одностороннего анализа вариантов, используя тест Ньюмена-Кейсла, с помощью программы GraphPad PRISM, версия 3.02 (Graphpad Software Inc).

Сцинтиграфию с темной стороны осуществляют с недельными интервалами. На восьмой день, в день обработки, эмиссию света обнаруживают только в местах инокуляции в хвосте. Образование опухоли в удаленных местах обнаруживают в день 14 у всех мышей контрольной группы, получавшей изотипическое контрольное антитело (huIgG1), и у одной мыши из группы, получавшей ритуксимаб. В последующие недели эмиссия света постоянно повышается. На фиг. 42 даны изображения мышей в день 39 (31 день после обработки), где биолуминесценция представлена красным цветом (темные области у мышей) (интенсивность света > 50 фотонов за 5 мин), который налагается на черно-белое изображение мышей. Массу опухоли количественно определяют в дни 25, 32, 39 и 46, интегрируя области световых сигналов на поверхности тела, ср. фиг. 43. Наиболее быстрый рост опухоли наблюдается в группе, получавшей изотипическое контрольное антитело. Обработка ритуксимабом приводит к значительной задержке роста опухоли. Однако ингибирование (задержка) роста опухоли под действием 2F2T, 11B8T и B1 значительно более значительна (уровни значимости см. ниже в табл. 2).

Таблица 2

Уровни значимости разницы общей интенсивности света между группами в различные моменты времени (временные точки)

	День 25	День 32	День 39	День 46
B1 vs. ритуксимаб	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001
B1 vs. 11B8T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
B1 vs. 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
B1 vs. huIgG1	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	
ритуксимаб vs. 11B8T	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001
ритуксимаб vs. 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001
ритуксимаб vs. huIgG1	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.05	
11B8T vs. 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
11B8T vs. huIgG1	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	
2F2T vs. 11B8T	P < 0.001	P < 0.01	P < 0.01	

Пример 13. Пилотное и фармакокинетическое исследование на макаках циномолгус.

Целью является определить фармакокинетический паттерн и фармакологическое действие 2F2 у макак циномолгус (примерный возраст 2 года; вес в пределах 2.1-2.6 кг) после однократной ежедневной инфузии (в подкожную вену в ноги) 4 дня подряд. В данном исследовании также проводится сравнение фармакологического действия ритуксимаба для определения его эквивалентного потенциала. С этой целью 6 самцов и 6 самок макак циномолгус разбивают на 6 групп в зависимости от дозы, которые получают 2F2 или ритуксимаб при уровнях доз 1.25, 6.25 и 12.5 мг/кг/день при постоянном объеме дозы 10 мл/кг 4 дня подряд, всего 5, 25 и 50 мг/кг соответственно. После введения последней дозы животных оставляют для последующего наблюдения в течение 130 дней. Практическая работа и методики в ходе этого изучения соответствуют Правилам работы в лаборатории (Good Laboratory Practice) ОБСЕ, установленным Министерством здравоохранения Великобритании. У всех животных регулярно проверяют признаки заболевания или реакцию на лечение и их подвергают физическому исследованию. В процессе лабораторных гематологических исследований определяют свертывание крови, проводят клинический анализ и анализ мочи. Образцы крови и биопсии лимфатических узлов получают (из поверхностных лимфатических узлов) для анализа проточной цитометрией в процессе введения доз и в период последующего наблюдения. Проточной цитометрией анализируют следующие клеточные фенотипы: CD3, CD4, CD8, CD20 и CD21. По завершении периода наблюдения после последнего введения доз животных умерщвляют и проводят подробную аутопсию.

Не наблюдается клинических признаков побочного действия или любых проявлений, о которых можно сказать, что они связаны с лечением 2F2 или ритуксимабом. На фиг. 44 и 45 показан анализ с помощью проточной цитометрии клеток периферической крови, экспрессирующих CD20 или CD21. На фиг. 46 показан анализ клеток лимфатических узлов, экспрессирующих CD20 или CD21, методом проточной цитометрии. Вместе оба анализированных в ходе исследования фенотипа показывают сильное и эффективное истощение В-клеток после введения 2F2 и ритуксимаба при дозе 6.25 мг/кг/день (всего 25 мг/кг) и 12.5 мг/кг/день (всего 50 мг/кг). Кроме того, данные показывают, что репопуляция клеток, экспрессирующих CD20 в лимфатических узлах и периферической крови животных, получавших 2F2, снова начинается на 75 день после приема тотальных доз 25 и 50 мг/кг, т.е. заметно позже, чем у животных, получавших ритуксимаб.

Кроме того, на фиг. 47А-С показаны результаты анализа методом проточной цитометрии субпопуляций клеток периферической крови, экспрессирующих CD20^{low}CD23⁺CD40^{high} (Y. Vugmeyster et al. (2003) Cytometry 52A:101-109).

Клетки периферической крови обезьян, получавших 2F2 или ритуксимаб при уровне доз 1.25 мг/кг (фиг. 47А), 6.25 мг/кг (фиг. 47В) и 12.5 мг/кг (фиг. 47С) в виде инфузии один раз в день ежедневно 4 дня подряд, инкубируют с FITC мышинным моноклональным антителом против человеческого CD20 (Coulter) при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем вместе с PBS прибавляют гранулы для подсчета и клетки дважды отмывают (300 г за 10 мин), а затем сразу же анализируют на проточном цитометре (Beckman Coulter) субпопуляцию клеток, экспрессирующих CD20^{low}CD23⁺CD40^{high} в сравнении с субпопуляцией клеток, экспрессирующих CD20^{high}CD23⁺CD40^{low}. Результаты, показывающие число клеток, экспрессирующих CD20^{low}CD23⁺CD40^{high}, выражаются как клетки/на 1 мл. Как видно на фиг. 47, антитело 2F2 способно вызывать полное и более продолжительное истощение клеток, экспрессирующих CD20^{low}CD23⁺CD40^{high}, по сравнению с ритуксимабом.

Пример 14. Эпитопное картирование с применением сайт-направленного мутагенеза.

Исследования эпитопного картирования с применением подхода на основе мутагенеза показывает, что аланин в положении 170 (A170) и пролин в положении 172 (P172) во второй внеклеточной петле имеют важное значение для распознавания человеческого CD20 с помощью известных антител против CD20. В работах Динса (Deans) и коллег (M.J. Polyak, et al., *Blood*, (2002) 99(9): p. 3256-3262; M.J. Polyak, et al., *J. Immunol.*, (1998) 161(7): p. 3242-3248) связывание всех тестируемых mAbs против CD20 аннулируется (отменяется) при замене A170 и P172 на соответствующие остатки S170 и S172 мышинового CD20. Некоторая гетерогенность наблюдается при распознавании АхР эпитопа, однако, тогда как большинство антител, подобных ритуксимабу, распознают мышинный CD20 с S170 и S172, мутировавшими в A170×P172 последовательности человеческого происхождения, в некоторых других антителах требуются дополнительные мутации непосредственно рядом с N-концом последовательности АхР. Для того чтобы проверить, является ли мотив A17-×P172 важным для связывания антител по изобретению, осуществляют мутацию последовательности АхР в SxS с применением сайт-направленного мутагенеза (АхР мутант=A170S, P172S), клетки трансфецируют с мутантом АхР и ДНК CD20 дикого типа (WT) и сравнивают характеристики связывания mAbs против CD20.

Используя сайт-направленный мутагенез, получают дополнительные мутанты, P172S (пролин в положении 172 мутирует (меняется на) в серин), N166D (аспарагин в положении 166 мутирует в аспарагиновую кислоту) и N163D (аспарагин в положении 163 мутирует в аспарагиновую кислоту), чтобы оценить важность мутантных аминокислотных остатков для связывания антител по изобретению.

Для изучения этого вопроса конструируют вектор экспрессии CD20 амплификацией кодирующей последовательности, используя подходящие праймеры, вводящие сайты рестрикции в идеальную последовательность Козака для оптимальной экспрессии. Амплифицированный фрагмент расщепляют и лигируют в экспрессирующий вектор pEE13.4. После трансформации в *E. coli* проводят скрининг колоний на инсерты и два клона выбирают для секвенирования, чтобы подтвердить корректность последовательности. Конструкцию обозначают pEE13.4CD20HS.

Мутагенез осуществляют для того, чтобы ввести мутацию АхР и 20 мутаций мышиной последовательности в области внеклеточной петли человеческого CD20. Мутагенез проверяют с помощью расщепления рестриктазой и секвенирования. Конструкции транзитивно трансфецируют в клетках CHO (для АхР мутаций) или в клетках НЕК293F и анализируют через 24 и 48 ч после трансфекции проточной цитометрией.

Олигонуклеотидные ПЦР (PCR) праймеры.

Олигонуклеотидные праймеры синтезируют и количественно рассчитывают при использовании Isogen BV (Maarssen, The Netherlands). Праймеры восстанавливают в воде с концентрацией 100 пмоль/мкл и хранят при -20°C до нужного момента. Краткие сведения о ПЦР и секвенировании праймеров даны в табл. 3.

Определение оптической плотности нуклеиновых кислот.

Оптическую плотность определяют на приборе Ultrospec 2100 pro Classic (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию ДНК определяют, анализируя $OD_{260\text{ нм}}$, где одна единица $OD_{260\text{ нм}}=50$ мкг/мл. Эталонный раствор идентичен раствору, применяемому для растворения нуклеиновых кислот.

Выделение плазмидной ДНК из культуры *E. coli*.

Плазмидную ДНК выделяют из культуры *E. coli*, применяя наборы от Qiagen в соответствии с инструкциями производителя (Westburg BV, Leusden, The Netherlands). Для получения "объемных" количеств плазмиды используют либо набор Hi-Speed plasmid Maxi, либо набор Hi-Speed plasmid Midi (Qiagen). Для получения плазмиды в малых количествах (т.е. 2 мл культуры *E. coli*) применяют набор Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) и ДНК элюируют в 50 мкл ТЕ (Tris-HCl 110 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).

ПЦР амплификация.

Реакции ПЦР проводят в соответствии с рекомендациями производителя для ДНК полимеразы Pfu-Turbo© Hotstart (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл 1×ПЦР буфера для реакции, 200 мкМ dNTP, 6.7 пмоль прямого и обратного праймеров, около 1 нг матричной ДНК и 1 Ед. полимеразы Pfu-Turbo© Hotstart. Реакции ПЦР проводят в градиентном термоциклере (термоблоке) T-gradient Thermocycler 96 (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) по программе из 30 циклов: +95°C в течение 2 мин, затем 30 циклов: +95°C в течение 30 с, отжиг: градиент 45-65°C в течение 30 с и удлинение: +72°C в течение 2 мин с последующей конечной стадией удлинения 10 мин при 72°C, хранение при 4°C. По окончании реакционные смеси анализируют электрофорезом на агарозном геле.

Электрофорез на агарозном геле.

Электрофорез на агарозном геле проводят в соответствии с Sambrook (Molecular Cloning Laboratory Manual, 3rd edition), используя 50 мл гелей в буфере 1×Tris/уксусная кислота/EDTA (TAE). ДНК визуализируют включением этидия бромид в гель и наблюдением в УФ-свете. Изображение в геле регистрируют с помощью камеры CCD и системы анализа изображений (GeneGnome; Syngene, Cambridge, UK).

Расщепление рестриктазами.

Рестриктазы поставляются New England Biolabs (Beverly, MA) и применяются в соответствии с рекомендациями производителя. Как правило, 100 нг расщепляют с помощью 5 Ед. фермента(ов) в подходящем буфере в конечном объеме 10 мкл. Используют подходящие объемы реакционных смесей. Продукты расщепления инкубируют минимум в течение 60 мин при температуре, рекомендованной производителем.

В случае фрагментов, требующих двойного расщепления рестриктазами с несовместимыми требованиями относительно буфера или температуры расщепления проводят последовательно таким образом, чтобы для каждого фермента по очереди были предпочтительные условия.

Обработка щелочной фосфатовой.

Щелочную фосфатазу из креветок (USB, Cleveland, OH) используют согласно рекомендациям поставщика. Щелочная фосфатаза удаляет 5'-фосфатные группы на концах ДНК-фрагментов, тем самым предупреждая "самосшивание" ("самолигирование"). Особенно существенным является, когда "саморелигирование" ДНК-фрагмента может дать компетентный по репликации вектор. Фермент активен в большинстве буферов для фермента и добавляется по потребности. После расщепления фермент инактивируют, поднимая температуру до 70°C в течение 15 мин.

Очистка ПЦР и продукты взаимодействия с рестриктазами.

Очистку проводят с применением набора PCR Purificatin kit для элиминирования микроколичеств (от Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Коротко говоря, образцы ДНК разводят в 5 об. буфера для связывания I (Qiagen) и наносят на миниколонку в центрифужной пробирке Эппендорфа. Сборку (ансамбль) центрифугируют на настольной микроцентрифуге. Колонку дважды промывают буфером II (Qiagen): После буфера набор центрифугируют и промывную жидкость (flow-through) отбрасывают. Колонку сушат на центрифуге в отсутствие буфера. ДНК элюируют, пропуская через колонку буфера для элюирования, количественно определяют УФ-спектроскопией и содержание оценивают электрофорезом на агарозном геле.

Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля.

Когда требуется (т.е. когда присутствует несколько (много) фрагментов), образцы ДНК разделяют гель-электрофорезом и нужный фрагмент вырезают из геля и регенерируют, используя набор для экстракции в геле QIAEX II (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Коротко говоря, полосы ДНК вырезают из агарозного геля и расплавляют в подходящем буфере при +55°C. Добавляют полимер QIAEX II и инкубируют в течение 5 мин. Полимер QIAEX II осаждают (пеллеты) кратковременным центрифугированием (1 мин, 14000 g, RT) и отмывают водным буфером PE (дважды по 500 мкл). Под конец пеллеты сушат в ламинаре, а ДНК элюируют соответствующим объемом TE и при соответствующей температуре (в зависимости от размера ДНК).

Лигирование ДНК-фрагментов.

Лигирование проводят с применением набора для быстрого лигирования Quick Ligation Kit (New England Biolabs) в соответствии с рекомендациями производителя. Для каждого лигирования векторную ДНК смешивают примерно с 3-кратным молярным избытком ДНК инсерта, так что общее количество ДНК составляет менее 200 нг в 10 мкл, при необходимости до нужного объема доводят водой. К этой смеси прибавляют 10 мкл 2×Quick Ligation Buffer (буфера для быстрого лигирования и 1 мкл Quick T4 ДНК лигазы) и смесь для лигирования инкубируют в течение 5-30 мин при комнатной температуре.

Трансформация ДНК в бактерии.

Образцы ДНК используют для трансформации единичных One Shot DH5α-T1R компетентных клеток E. coli (Invitrogen, Breda, The Netherlands) в соответствии с инструкциями производителя. Коротко говоря, 1-5 мкл раствора ДНК (как правило, 2 мкл смеси для лигирования ДНК) добавляют к аликвоте трансформированных компетентных бактериальных клеток и указанную смесь инкубируют на льду в течение 30 мин. Затем клетки подвергают тепловому шоку, перенося в водяную баню с температурой 42°C на 30 с с последующей дополнительной инкубацией на льду в течение 5 мин. Клетки оставляют для регенерации с помощью инкубации в неселективной культуральной среде (SOC) на 1 ч при встряхивании при 37°C, а затем наносят (распластывают) на плашки с агар-агаром, содержащие подходящий селективный агент (ампициллин в концентрации 50 мкг/мл). Плашки инкубируют в течение 16-18 ч при +37°C или до тех пор, пока колонии бактерий не станут явными.

Скрининг колоний бактерий методом ПЦР.

Бактериальные колонии подвергают скринингу на присутствие векторов, содержащих заданные последовательности, методом ПЦР для скрининга колоний. 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5 об. смеси HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 4 пмоль прямого и обратного праймеров и дополненной водой, помещают в пробирку ПЦР. Колоний лишь слегка касаются кончиком пипетки на 20 мкл, один раз коснувшейся культур LB в пробирке на 2 мл (для выращивания бактерий, содержащих соответствующую плазмиду) и ресуспендируют в 20 мкл смеси ПЦР. PCR проводят в T-градиентном термоциклере (термо-блоке) T-gradient Thermocycler 96 (Biometra) по программе из 30 циклов: +95°C в течение 15 мин, затем 35 циклов: +94°C в течение 30 с, отжиг: градиент 55°C в течение 30 с и удлинение: +72°C в течение

2 мин с последующей конечной стадией удлинения 10 мин при 72°C, последующее хранение при 4°C. По окончании реакционные смеси анализируют электрофорезом на агарозном геле; см. в табл. 3 подробное описание пар праймеров, применяемых в ПЦР для колоний.

Секвенирование ДНК.

Образцы плазмид посылают на AGOWA (Berlin, Germany) для секвенирования. Последовательности анализируют с помощью программного обеспечения VectorNTI (Informax, Frederick, MD, USA).

Таблица 3

Название	Применение	Длина	Последовательность олигонуклеотида
CD20P172S	CD20 мутагенез	36	TGGGGAGTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACAGTTGTA
CD20N166D	CD20 мутагенез	39	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
CD20N163D	CD20 мутагенез	36	AATCATGGACATACTTAATATTA
cd20exfor	CD20 конструкция	41	TATAGCCCGGGCCGCCACCATGACAACACCCAGAAAATTC
cd20exrev	CD20 конструкция	38	GCGTCTCATGTACATTAAGGAGAGCTGTCATTTCTAT
pee134seqrev2	ПЦР колоний	23	TCCGACATCTCATGACTTTCTT
pConKseq1	ПЦР колоний	23	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTGGC
cd20hsarpmtr (AxP)	CD20 мутагенез	42	TGGGOAGTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACAGTTGTA
cd20hsarpmtrf (AxP)	CD20 мутагенез	42	TACAACGTGAACCATCGAATTCCTTGAGAAAACTCCCA
CD20seq2	CD20 секвенирование	23	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
cd20seq1	CD20 секвенирование	23	AATCATGGACATACTTAATATTA

Мутагенез.

Мутагенез осуществляют с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза Quik-Change® XL (Cat 200517-5, Lot 1120630, Stratagene Europe) в соответствии с инструкциями производителя.

Реакционные смеси для мутагенеза концентрируют осаждением из этанола и трансформируют либо в единичные (oneshot) DH5 α -T1R компетентные клетки *E. coli*, либо электропорацией в ElectroTen-Blue® электрокомпетентные клетки. Перед трансфекцией колонии проверяют с помощью ПЦР колоний и расщеплением рестриктазами.

Трансфекция клеток НЕК293F.

Клетки НЕК293F получают от Invitrogen и трансфецируют в соответствии с инструкциями производителя с применением 293fectin. Клетки НЕК293F используют для всех единичных мутантных последовательностей.

Трансфекция клеток CHO.

Клетки CHO, выращенные примерно до 95% монослоя, транзитивно трансфецируют с CD20 дикого типа, мутантной кДНК или комбинацией обеих конструкций, используя липофектамин 2000 (M668-019, Invitrogen, Breda, Netherlands). Для этой цели 24 мкг осажденной ДНК разводят (1 мкг/мл) в 500 мкл оптимем (optimem) в соотношениях AxP 100%: WT 0%; AxP 33.3%: WT 66.6%; AxP 66.6%: WT 33.3%; AxP 0%:WT 100%. Для каждой трансфекции 24 липофектамина разводят в 500 мкл оптимем. Затем разведенный липофектамин инкубируют (RT, 5 мин) и разведенную ДНК объединяют с разведенным липофектаминоном. Осторожно перемешивают и инкубируют раствор (RT, 20 мин), 1000 мкл ДНК/липофектамина прибавляют к клеткам CHO, тщательно перемешивают и инкубируют в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂. Через 2 дня после трансфекции CHO клеток клетки дважды отмывают буфером FACS (PBS, дополненный 0.1% BSA и 0.002% NaN₃). Клетки CHO обрабатывают трипсином/EDTA (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) и снимают с плашек с культурой.

Связывание с антителом против CD20.

Клетки НЕК293F и клетки CHO помещают в PBS в концентрации 2×10⁶ мл и помещают в круглодонные планшеты (1×10⁵/лунка). Затем добавляют 50 мкл CD20 mAb в серийных разведениях 10, 5, 2.5 или 0 мкг на лунку (4°C, 30 мин). После отмывания в буфере FACS (PBS, дополненный 0.1% BSA и 0.002% NaN₃) клетки анализируют на проточном цитометре (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA), и при высокой скорости потока требуется 5000 событий на образец.

Как видно на фиг. 48А-Е, все mAbs против CD20 эффективно связываются с клетками CHO, экспрессирующими WT (дикого типа) CD20. Как и предполагалось, ритуксимаб не связывается с AxP мутантом (фиг. 48А), а В1 слабо связывается с этим мутантом (фиг. 48D). Напротив, как 2F2, так и 11B8 равно одинаково связываются с WT и AxP мутантом CD20 (фиг. 48В и 48С). Однако титрование количества WT CD20 на поверхности показывает только связывание ритуксимаба и В1. Снова как 2F2, так и 11B8 нечувствительны к отсутствию или присутствию мутации.

Это исследование показывает, что связывание 2F2 и 11B8 с человеческим CD20 нечувствительно к мутациям в аминокислотных положениях 170 и 172. Следовательно, 2F2 и 11B8 представляют собой новый класс mAbs к CD20, распознающих новый CD20 эпитоп.

На фиг. 49А показан процент связывания 2F2, 11B8Т, В1 или ритуксимаба с мутантом P172S vs. (по сравнению с) WT CD20, на фиг. 49В показан процент связывания 2F2Т, 11B8Т, В1, CAT (CAT 13.6E12, мышинное моноклональное IgG2A антитело против CD20, Diatec.Com), контрольного изотипического антитела (KLH) или ритуксимаба с мутантным CD20 (AxP) vs. (по сравнению с) WT CD20.

В случае мутанта, в котором аспарагин в положении 166 заменен на аспарагиновую кислоту

(CD20N166D), 2F2 показывает очень низкую степень связывания, тогда как B1, ритуксимаб и 11B8Т способны связываться, см. фиг. 49С. В аналогичном эксперименте САТ 13.6Е12 и ритуксимаб способны связываться с CD20N166D, тогда как 2F2Т показывает только очень низкую степень связывания, см. фиг. 49D. В случае мутанта, в котором аспарагин в положении 163 заменен на аспарагиновую кислоту (CD20N163D), снова ритуксимаб, 11B8Т и B1 способны связываться с CD20N163D, тогда как 2F2 и 2F2Т показывают только очень низкую степень связывания, см. фиг. 49Е. В аналогичном эксперименте САТ 13.6Е12 и ритуксимаб способны связываться с CD20N163D, тогда как 2F2Т показывает только очень низкую степень связывания, см. фиг. 49F.

Эти эксперименты показывают, что 2F2 и 11B8 связываются с различными эпитопами.

Пример 15. Эпитопное картирование с применением метода Pepscan.

Синтез пептидов: 1-, 9- и 15-мерные пептиды синтезируют стандартными методами. В некоторых случаях химическое связывание 15-мерного пептида помогает идентифицировать аминокислотные последовательности потенциально "прерывистого" эпитопа. По известным методикам (Н.М. Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998; J.W. Sloodstra et al. (1996) Mol. Drivers 1:87 и WO 01/60769) синтезируют 7-, 9- и 15-мерные пептиды, которые могли быть сайтами связывания или эпитопами, включенными в связывание 2F2 или 11B8 с молекулой человеческого CD20. 9- и 15-меры синтезируют как петли и подвергают скринингу в платах mini-PEPSCAN в формате кредитной карты (формат 455 пептидов/плата). Во всех петлеобразных пептидах аминокислоты в изменяющихся положениях заменяют на цистеин (например, ацетил-ХСХХХХХХХХХХСХ-миникарта). Пептиды синтезируют стандартным химическим методом с Fmoc-защитой и депротекцией с помощью ТФК с акцептором (кислоты). Затем депротекционированные пептиды реагируют на микроматрице с 0.5 мМ раствором 1,3-бис-(бромметил)бензолом в бикарбонате аммония (20 мМ, рН 7.9), дополненном ацетонитрилом (1:1 (об./об.)). Микроматрицы осторожно встряхивают в растворе в течение 30-60 мин, пока они полностью не покроются раствором. Наконец, микроматрицы интенсивно отмывают избытком Millipore H₂O и подвергают ультразвуковой дезинтеграции в буфере, содержащем 1% додецилсульфата натрия, 0.1% β-меркаптоэтанола в PBS (рН 7.2), при 70°C в течение 30 мин с последующей ультразвуковой дезинтеграцией в Millipore H₂O еще в течение 45 мин. Затем лунки микропланшета готовы для скрининга методом ELISA.

Анализ Pepscan ELISA.

455-луночные полиэтиленовые платы в формате кредитной карты, содержащие ковалентно связанные пептиды, инкубируют с сывороткой (в разведении 1:1000 в блокирующем растворе, содержащем 5 об.% лошадиной сыворотки и 5% яичного белка (вес./об.)) (4°C, в течение ночи). После отмывания пептиды инкубируют с пероксидазой человеческих антител (разведение 1:1000, 1 ч, 25°C) и после отмывания пероксидазного субстрата добавляют 2,2-азиноди-3-этиленбистиазолинсульфонат и 2 мкл/мл 3% H₂O₂. Через 1 ч измеряют проявление цвета. Проявление цвета ELISA количественно рассчитывают с использованием CCD-камеры и системы процессинга изображения. Установка состоит из CCD-камеры и 55-мм линзы (Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon микронник или линза 55 мм f/2.8), фотоприставка (Sony Camera adaptor DC-77RR) и программное обеспечение системы процессинга изображения Optimas, версия 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, U.S.A.). Программное обеспечение Optimas установлено на компьютерной системе Pentium II.

Оптическая плотность (значения OD) пептидов при различных концентрациях антител представлена ниже в табл. 4 и 5.

Таблица 4

	11B8 10 мкг/мл	11B8 100 мкг/мл	7D8 10 мкг/мл	7D8 100 мкг/мл	ритуксимаб 10 мкг/мл	2F2 10 мкг/мл	2F2 100 мкг/мл	B1 10 мкг/мл	B1 100 мкг/мл
КМЕCLNFIRAHCPYI	763	2997	134	41	90	48	66	147	304
LKMECLNFIRCHTPY	165	738	160	41	120	49	87	179	216
КMECSCNFIRACTPYI	625	3090	142	52	123	39	78	170	308
MESLCFIRAHCPYIN	179	956	127	55	102	41	65	119	178
CFIRAHTPC	188	534	181	69	134	91	114	170	212
CIRAHTPYC	151	449	186	60	132	57	92	151	195
CRAHTPYIC	427	1605	188	64	145	48	87	179	216
CAHTPYINC	179	452	174	65	125	42	106	161	172
IPAGIYA	217	950	164	76	177	48	85	165	192
PAGIYAP	449	2501	170	64	111	43	85	165	300
AGIYAPI	251	2207	188	73	110	44	98	187	143
GIYAPIC	99	251	152	64	141	34	93	177	147
IYAPICV	137	313	174	58	159	58	99	175	90
GIYAPIA	172	857	177	96	156	62	96	165	121
IYAPIAV	161	654	181	58	116	62	76	161	106

Таблица 5

	11B8 10 мкг/ мл	7D8 10 мкг/ мл	ритукси- маб 10 мкг/мл	2F2 10 мкг/мл
PCINIYNAEPANPCE	118	163	152	65
YCNINNAEPANPCK	287	181	2418	86
ICINNAEPANPSECN	138	192	142	78
NCYNAEPANPSEKCS	93	121	2649	49
ICNAEPANPSEKNCP	115	165	3283	43
YCAEPANPSEKNSCS	106	188	3770	65
NCEPANPSEKNSPCT	159	183	3476	61
ACFANPSEKNSPSCQ	146	148	250	77
ECANPSEKNSPSTCY	134	179	188	68

Как явствует из табл. 4, в случае 11B8 наблюдается связывание с последовательностью AGIYAP малой первой внеклеточной петли человеческого CD20 как при концентрации 10 мкг/мл, так и при концентрации 100 мкг/мл, в то время как для других исследованных антител не наблюдается заметное связывание с фрагментом AGIYAP.

Кроме того, для 11B8 наблюдается связывание с последовательностью MESLNFIRАНТРУІ второй внеклеточной петли человеческого CD20 как при концентрации 10 мкг/мл, так и при концентрации 100 мкг/мл, в то время как для других исследованных антител не наблюдается заметное связывание с фрагментом MESLNFIRАНТРУІ.

Как явствует из табл. 5, для ритуксимаба наблюдается связывание с EPANPSEK второй внеклеточной петли человеческой CD20 как при концентрации 1 мкг/мл, так и при концентрации 10 мкг/мл, в то время как для других исследованных антител не наблюдается заметное связывание с фрагментом EPANPSEK.

Пример 16. Антиидиотипические антитела.

Получение антиидиотипических антител.

Мышьиные антиидиотипические антитела получают иммунизацией мышей Balb/C с помощью 2F2 или 11B8T и образованием гибридом из селезенок этих мышей путем слияния с NS1 клетками миеломы стандартными методами. Получают следующие антиидиотипические антитела: анти-2F2 sab 1.1, анти-2F2 sab 1.2, анти-2F2 sab 1.3, анти-11B8T sab 2.2, анти-11B8T sab 2.3, анти-11B8T sab 2.4, анти-11B8T sab 2.5 и анти-11B8T sab 2.6. Их проверяют на специфическое связывание с 2F2T, 7D8 и 11B8T. Планшеты ELISA покрывают очищенными 2F2T, 7D8 или 11B8T (разведенными в PBS до конечной концентрации 1-2 мкг/мл, 37°C, 2 ч). Планшеты блокируют PBS, содержащим 0.05% Tween-20 и 2% куриной сыворотки (RT, 1 ч). Затем планшеты инкубируют с супернатантами культур антиидиотипических антител (конечную концентрацию доводят до 1-10 мкг/мл, RT, 2 ч). Связанные мышьиные антиидиотипические антитела обнаруживают с использованием кроличьего IgG-HRP-конъюгированного антитела против мыши (Jackson ImmunoResearch).

Как показано на фиг. 50, анти-2F2 sab 1.1, анти-2F2 sab 1.2 и анти-2F2 sab 1.3 связываются с 2F2T и 7D8, но не с 11B8T или неродственным изотипическим контрольным человеческим антителом. Так как 2F2T и 7D8 имеют высокую степень гомологии последовательности V_L и V_H , предполагалось, что анти-2F2-идиотипические антитела реагируют с 7D8.

На фиг. 51 показано, что анти-11B8T sab 2.2, анти-11B8T sab 2.3, анти-11B8T sab 2.4, анти-11B8T sab 2.5 и анти-11B8T sab 2.6, все, связываются с 11B8T в сходной степени.

Антиидиотипические антитела как инструмент иммунодиагностики.

Антиидиотипические антитела 2F2/7D8 и 11B8T можно использовать в качестве инструмента иммунодиагностики для обнаружения и количественного определения уровней человеческих моноклональных антител против CD20 в лабораторных образцах или в образцах пациентов. Это можно применять для изучения фармакокинетики антитела против CD20 или обнаружения и корректировки дозировки антитела против CD20 и для мониторинга заболевания и эффекта лечения пациента. Пример такого анализа: планшеты для ELISA покрывают, используя 4 мкг/мл анти-2F2 sab 1.1, анти-2F2 sab 1.2 или анти-2F2 sab 1.3. Планшеты блокируют PBS, содержащим 0.05% Tween-20 и 2% куриной сыворотки (RT, 1 ч). Затем планшеты инкубируют в серийном разведении 2F2T (10000-9.77 нг/мл, RT, 2 ч). Связанный 2F2T детектируют с использованием мышьиного HRP-конъюгированного антитела против человеческого IgG. Как показано на фиг. 52A-C, наблюдается зависимость связывания 2F2T от дозы.

Эквиваленты

Опытные специалисты в данной области техники признают или смогут убедиться с помощью лишь рутинных экспериментов, что существует множество эквивалентов специфических вариантов изобретения по данному описанию. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются нижеприведенной формулой изобретения. Считается, что любая комбинация вариантов изобретения, описанных в зависимых пунктах формулы изобретения, входит в объем данного изобретения.

Включение в описание изобретения сведений с помощью ссылок

Все патенты, рассматриваемые патентные заявки и другие публикации, цитированные в данном описании, вводятся в качестве ссылок во всей полноте.

Перечень последовательностей

<110> Teeling, Jessica
 Ruuls, Sigrid
 Glennie, Martin
 van de Winkel, Jan G.J.
 Parren, Paul
 Petersen, Jorgen
 Baadsgaard, Ole
 Huang, Haichun

<120> ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD20

<130> 4086.1000-002

<140> 10/687,799
 <141> 2003-10-17

<150> 60/419,163
 <151> 2002-10-17

<150> 60/460,028
 <151> 2003-04-02

<160> 57

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 424
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaagggtg ccagtggtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac cttaaatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
 ggggaagggcc tggagtgggt ctcaactatt agttggaata gtgggtccat aggctatgcg 240
 gactctgtga agggcggatt caccatctcc agagacaacg ccaagaagtc cctgtatctg 300
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa agatatacag 360
 tacggcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
 tcag 424

<210> 2
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

021644

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 382
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccacccga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctgggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 360
gggacacgac tggagattaa ac 382

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 424
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg acagggtcct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttcatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaactatt agttggaata gtggtaccat aggctatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgatt actgtgcaaa agatatacag 360
tacggcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
tcag 424

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr

021644

```

                20                25                30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45
Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
                50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
                100                105                110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                115                120

```

<210> 7
 <211> 382
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 7
atggaagccc cagctcagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 360
gggacacgac tggagattaa ac 382

```

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 8
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1                5                10                15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
                20                25                30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35                40                45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
                100                105

```

<210> 9
 <211> 433
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 9
atggagttgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60
gttcagctgg tgcagctctg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtacaggct ctggattcac cttcagttac catgctatgc attgggttcg ccaggctcca 180
ggaaaaggtc tggaatgggt atcaattatt gggactggtg gtgtcacata ctatgcagac 240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgtca agaactcctt gtatcttcaa 300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagaga ttactatggt 360
gcggggagtt tttatgacgg cctctacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420

```

accgtctcct cag

433

<210> 10
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11
 <211> 382
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 atggaagccc cagcacagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagcccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcgact ggccgctcac tttcggcgga 360
 gggaccaagg tggagatcaa ac 382

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Asp Tyr Ala Met s
 1 5

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Hi

Tyr His Ala Met His
1 5

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 31
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 31
 gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc 32

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 32
 gctgtgcccc cagaggtgct cttggagg 28

<210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<220>
 <221> variation
 <222> (6)...(6)
 <223> n = T or G

<400> 33
 caggtncagc tgggtgcagtc 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<220>
 <221> variation
 <222> (1)...(1)
 <223> n= C or G

<220>
 <221> variation
 <222> (13)...(13)
 <223> n = T or G

<400> 34
 naggtgcagc tgntggagtc 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 35
 gaggtgcagc tgggtgcagtc 20

<210> 36
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 36
 atggactgga cctggagcat c 21

 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 37
 atggaattgg ggctgagctg 20

 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <220>
 <221> variation
 <222> (12)...(12)
 <223> n = A or G

 <400> 38
 atggagtttg gnetgagctg 20

 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 39
 atgaaacacc tgtggttctt c 21

 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 40
 atggggtcaa cgcctcct 20

 <210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>

<223> Primer
 <400> 41
 tgccagggg aagaccgatg g 21
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <220>
 <221> variation
 <222> (1)...(1)
 <223> n = A or G
 <220>
 <221> variation
 <222> (14)...(14)
 <223> n = C or T
 <400> 42
 nacatccaga tgancagtc 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <220>
 <221> variation
 <222> (2)...(2)
 <223> n = C or T
 <220>
 <221> variation
 <222> (7)...(7)
 <223> n = C or T
 <220>
 <221> variation
 <222> (8)...(8)
 <223> n = A or G
 <400> 43
 gncatcnnga tgaccagtc 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 44
 gatattgtga tgaccagac 20
 <210> 45

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <220>
 <221> variation
 <222> (15)...(15)
 <223> n = A or G

 <400> 45
 gaaattgtgt tgacncagtc 20

 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <220>
 <221> variation
 <222> (6)...(6)
 <223> n = A or T

 <220>
 <221> variation
 <222> (9)...(9)
 <223> n = A or G

 <400> 46
 gaaatngtna tgacacagtc 20

 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 47
 gatgttga tgacacagtc 20

 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 48
 gaaattgtgc tgactcagtc 20

 <210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>

<223> Primer

<400> 49
cccgcctcagc tcctggggct cctg 24

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 50
ccctgctcag ctctggggc tgc 23

<210> 51
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 51
cccagcgcag cttctcttcc tctgca 26

<210> 52
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 52
atggaaccat ggaagcccca gcacagc 27

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 53
cgggaagatg aagacagatg 20

<210> 54
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp

021644

65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg
 115

<210> 55
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110
 Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135

<210> 56
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 115 120 125
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 57
 <211> 127
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1                               10                               15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20                               25                               30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35                               40                               45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50                               55                               60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65                               70                               75                               80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85                               90                               95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100                              105                              110
Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 115                              120                              125

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое моноклональное антитело, связывающееся с человеческим CD20 и включающее CDR1 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 14, CDR3 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 15, CDR1 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 18 или CDR1 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 19, CDR2 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 20, CDR3 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 21, CDR1 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 22, CDR2 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 23 и CDR3 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 24.

2. Антитело по п.1, выбранное из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, секреторного IgA, IgD и IgE антител.

3. Антитело по п.2, представляющее собой IgG1 антитело.

4. Антитело по п.2, представляющее собой IgG3 антитело.

5. Антитело по п.2, представляющее собой IgG4 антитело.

6. Антитело по п.2, представляющее собой IgA1 или IgA2 антитело.

7. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее вариабельные области тяжелой и к-легкой цепей человеческого происхождения, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3 соответственно.

8. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее вариабельные области тяжелой и к-легкой цепей человеческого происхождения, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7 соответственно.

9. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее вариабельные области тяжелой и к-легкой цепей человеческого происхождения, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 соответственно, или консервативные модификации последовательностей этих цепей.

10. Антитело по любому из пп.1-6, имеющее вариабельные области тяжелой цепи человеческого происхождения и к-легкой цепи человеческого происхождения, которые по меньшей мере на 90% гомологичны, предпочтительно по меньшей мере на 95% гомологичны и более предпочтительно по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 соответственно.

11. Антитело по любому из пп.1-6, имеющее вариабельные области тяжелой цепи человеческого происхождения и к-легкой цепи человеческого происхождения, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8 соответственно, или консервативные модификации последовательностей этих цепей.

12. Антитело по любому из пп.1-6, имеющее вариабельные области тяжелой цепи человеческого происхождения и к-легкой цепи человеческого происхождения, которые по меньшей мере на 90% гомологичны, предпочтительно по меньшей мере на 95% гомологичны и более предпочтительно по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8 соответственно.

13. Антитело по любому из пп.1-12, которое представляет собой интактное антитело, выбранное из группы, состоящей из интактного IgG1 антитела, интактного IgG2 антитела, интактного IgG3 антитела, интактного IgG4 антитела, интактного IgM антитела, интактного IgA1 антитела, интактного IgA2 антитела, интактного секреторного IgA антитела, интактного IgD антитела и интактного IgE антитела, отличающееся тем, что антитело является гликозилированным в клетке эукариот.

14. Антитело по любому из пп.1-13, являющееся фрагментом антитела или одноцепочечным анти-

телом.

15. Эукариотическая или прокариотическая клетка-хозяин, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей человеческого моноклонального антитела, раскрытые в пп.9-12.

16. Фармацевтическая композиция, ингибирующая рост или вызывающая гибель клеток, экспрессирующих CD20, содержащая человеческое моноклональное антитело по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, содержащая антитело по п.9 и дополнительный терапевтический агент, представляющий антитело, связывающееся с CD20 человеческого происхождения и имеющее переменные области тяжелой и легкой цепей человеческого происхождения, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12 соответственно, или консервативные модификации последовательностей этих цепей.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16, 17, дополнительно содержащая терапевтический агент, выбранный из цитотоксического агента, радиотоксического агента, иммунодепрессанта и иммунологического модулирующего агента.

19. Антитело по любому из пп.1-14, дополнительно содержащее линкер-хелатор для связывания радиоактивного изотопа.

20. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп.1-14, связанное с цитотоксическим агентом, радиоизотопом или лекарственным веществом.

21. Биспецифическая молекула, содержащая антитело по любому из пп.1-14 и группировку со специфичностью связывания с человеческой эффекторной клеткой.

22. Биспецифическая молекула, содержащая антитело по любому из пп.1-17 и группировку со специфичностью связывания с человеческим Fc-рецептором или группировку со специфичностью связывания с T-клеточным рецептором, таким как CD3.

23. Способ ингибирования роста клетки, экспрессирующей CD20, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела по любому из пп.1-14 таким образом, что рост клетки подавляется.

24. Способ киллинга клетки, экспрессирующей CD20, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела по любому из пп.1-14 таким образом, что происходит киллинг клетки, экспрессирующей CD20.

25. Способ по любому из пп.23 или 24, отличающийся тем, что клетка представляет собой В-лимфоцит или опухолевую клетку.

26. Способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD20, включающий введение субъекту человеческого антитела, композиции, иммуноконъюгата или биспецифической молекулы по любому из пп.1-14 или 16-22 в количестве, обеспечивающем эффективное лечение или предупреждение заболевания.

27. Способ по п.26, отличающийся тем, что заболевание представляет собой В-клеточную лимфому.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что заболевание представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что заболевание выбирают из группы, включающей В-лимфобластный лейкоз/лимфому из клеток-предшественников и опухоли из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/малая лимфоцитарная лимфома (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическую лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому (FL), кожную лимфому из клеток фолликулярных центров, В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (MALT типа, узлового типа, селезеночного типа), волосатоклеточный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркита, плазматому, миелому из плазматических клеток, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, макроглобулинемию Вальденстрема и анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL).

30. Способ по п.29, отличающийся тем, что заболевание представляет собой фолликулярную лимфому (FL).

31. Способ по п.29, отличающийся тем, что заболевание представляет собой В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/малую лимфоцитарную лимфому (SLL).

32. Способ по п.26, отличающийся тем, что заболевание выбирают из группы, состоящей из лимфоматоидного гранулематоза, первичной эффузионной лимфомы, интраваскулярной В-клеточной лимфомы, медиастиальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, заболеваний тяжелых цепей (включая γ , μ и α заболевание), лимфом, вызванных терапией иммунодепрессантами, таких как лимфома, вызванная циклоспорином, и лимфома, вызванная метотрексатом.

33. Способ лечения или предупреждения иммунного заболевания с участием иммунных клеток, экспрессирующих CD20, включающий введение субъекту антитела, композиции, иммуноконъюгата или биспецифической молекулы по любому из пп.1-14 или 16-22 в количестве, обеспечивающем эффективное лечение или предупреждение иммунного заболевания.

34. Способ по п.33, отличающийся тем, что лечение включает киллинг В-клеток, которые продуцируют антитела против аутоантигенов.

35. Способ по п.33, отличающийся тем, что болезнь или нарушение выбирают из группы, включающей псориаз, псориагический артрит, дерматит, системную склеродерму и склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс-синдром, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзему, астму, атеросклероз, недостаточность адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Сегрена, ювенильный диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, иммунный комплексный нефрит, IgA нефропатию, IgM полинейропатию, иммунные тромбоцитопении, такие как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическую анемию, тяжелую псевдопаралитическую миастению, волчаночный нефрит, системную красную волчанку, ревматоидный артрит (РА), атопический дерматит, пузырчатку, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, гранулематоз Вегенера, синдром Оменна, хроническую почечную недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ, заболевания, ассоциированные с вирусом герпеса, системный склероз и обыкновенную пузырчатку.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что заболевание представляет собой ревматоидный артрит (РА).

37. Способ по любому из пп.23-36, дополнительно включающий введение субъекту другого терапевтического агента, где терапевтический агент выбран из цитотоксического агента, радиотоксического агента, иммунодепрессанта и иммунологического модулирующего агента.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что терапевтический агент является цитотоксическим агентом или радиотоксическим агентом.

39. Способ по п.37, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой иммунодепрессант.

40. Способ по п.37, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой иммунологический модулирующий агент, такой как цитокин или хемокин.

41. Способ по п.37, отличающийся тем, что терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из доксорубина, цисплатина, блеомицина, кармустина, хлорамбуцила и циклофосфамида.

42. Способ по п.37, отличающийся тем, что терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из антител против CD25, антител против CD19, антител против CD21, антител против CD22, антител против CD37, антител против CD38, антител против IL6R, антител против IL8, антител против IL15, антител против IL15R, антител против CD4, антител против CD11a, антител против альфа-4/бета-1 интегрина (VLA4), CTLA4-Ig и антител против C3b(i).

43. Способ детектирования *in vitro* присутствия в образце антигена CD20 или клетки, экспрессирующей CD20, включающий контактирование образца с антителом по любому из пп.1-14 в условиях, допускающих образование комплекса между антителом и CD20, и выявление образованного комплекса.

44. Композиция для обнаружения присутствия в образце антигена CD20 или клетки, экспрессирующей CD20, содержащая антитело по любому из пп.1-14.

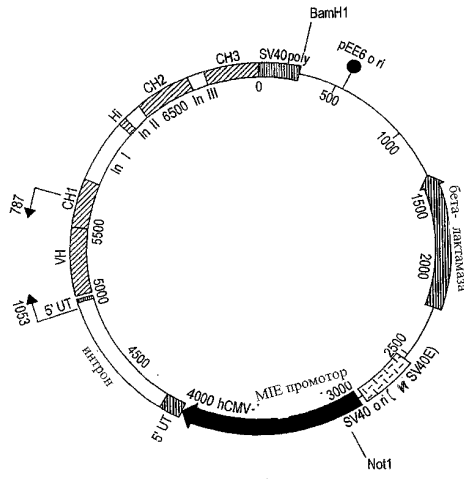
45. Способ обнаружения *in vivo* присутствия в организме субъекта антигена CD20 или клетки, экспрессирующей CD20, включающий введение в организм субъекта антитела по любому из пп.1-14 в условиях, допускающих образование комплекса между антителом и CD20, и выявление образованного комплекса.

46. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела, раскрытого в пп.9-12.

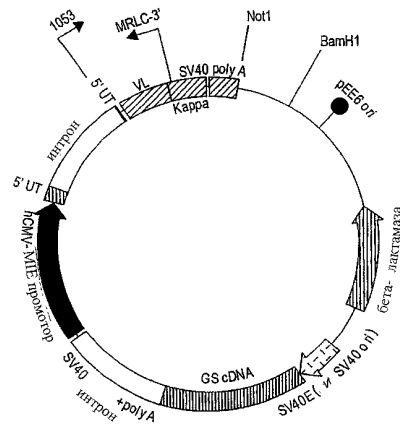
47. Фармацевтическая композиция, ингибирующая рост или вызывающая гибель клеток, экспрессирующих CD20, содержащая экспрессирующий вектор по п.46 и фармацевтически приемлемый носитель.

48. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с антителом по любому из пп.1-14.

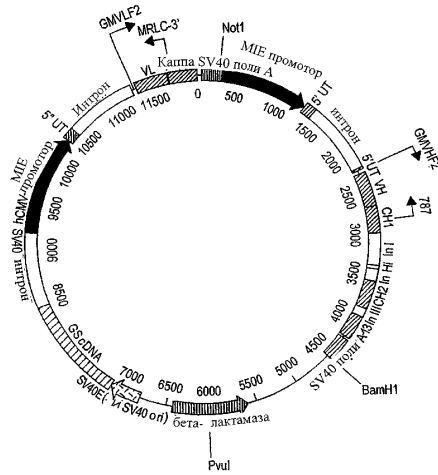
49. Применение антиидиотипического антитела по п.48 для детектирования уровня человеческого моноклонального антитела против CD20 по любому из пп.1-14 в образце.



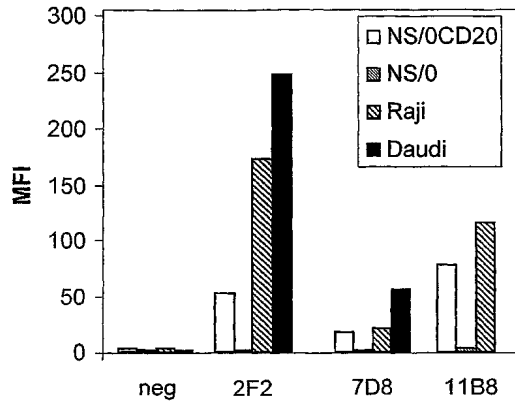
Фиг. 1



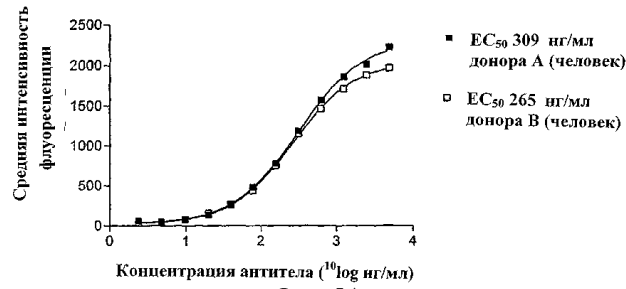
Фиг. 2



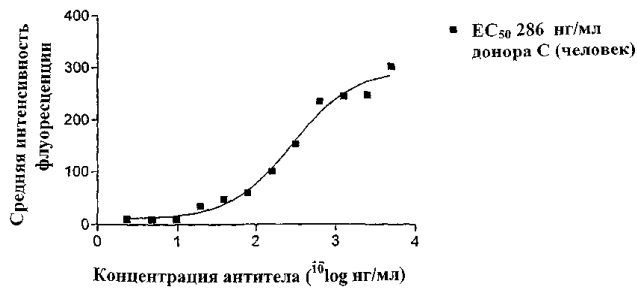
Фиг. 3



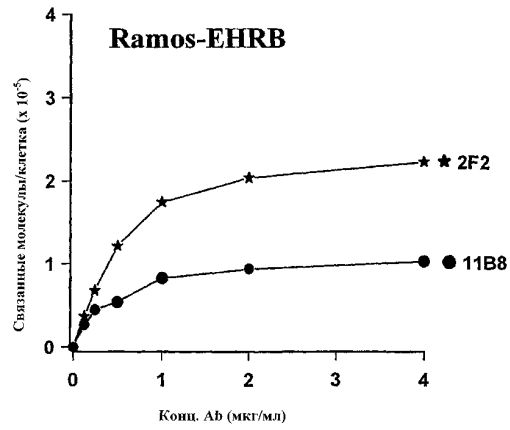
Фиг. 4



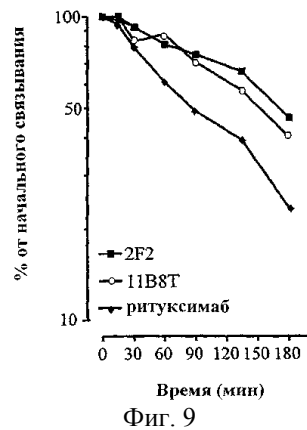
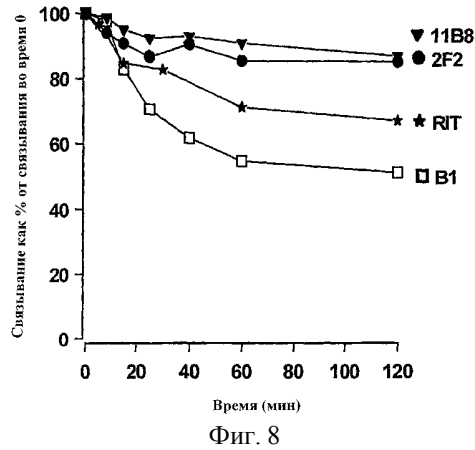
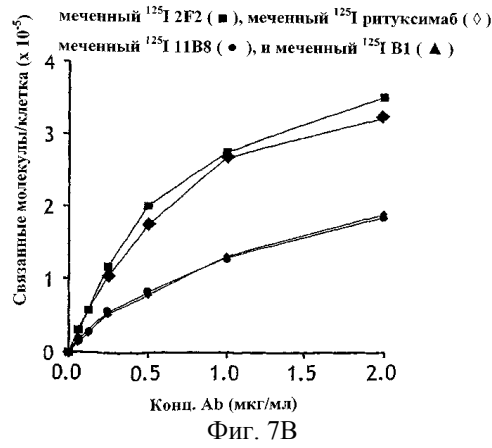
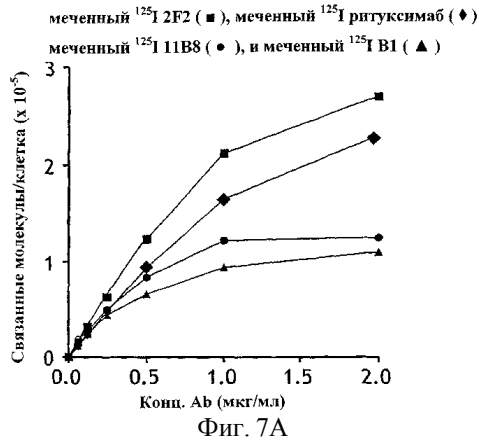
Фиг. 5А

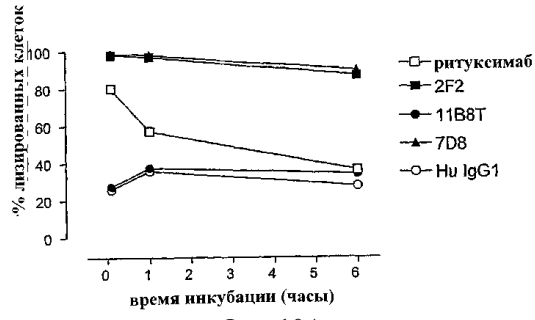


Фиг. 5В

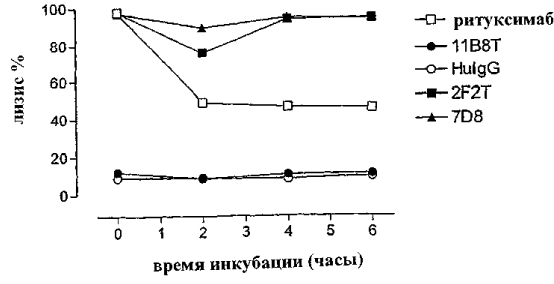


Фиг. 6

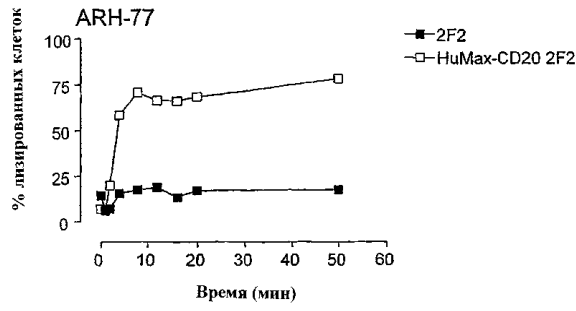




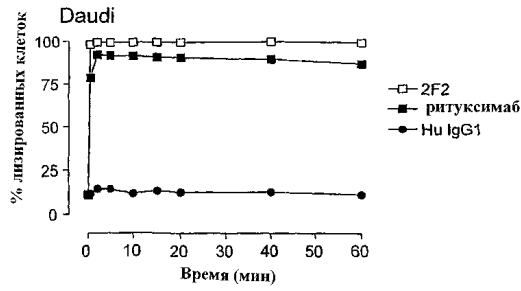
Фиг. 10А



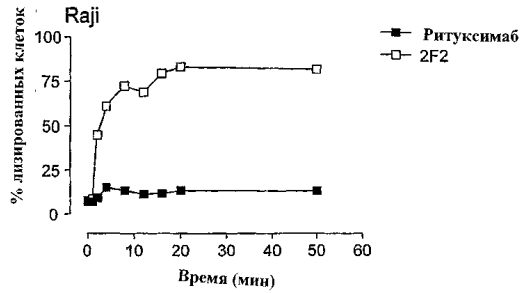
Фиг. 10В



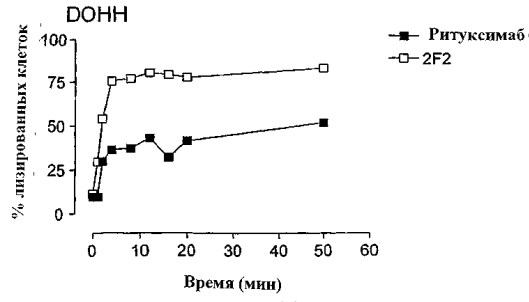
Фиг. 11А



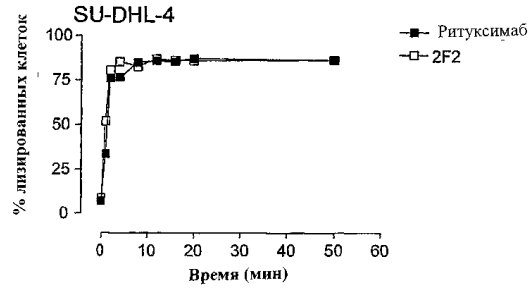
Фиг. 11В



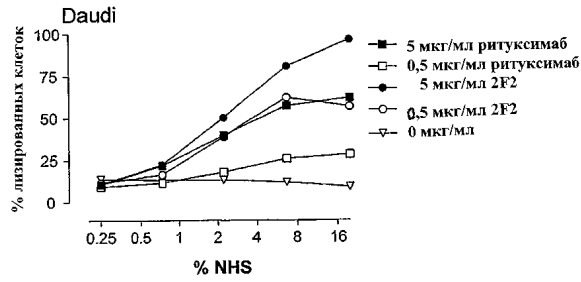
Фиг. 11С



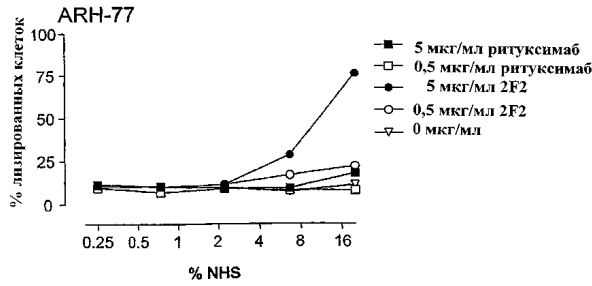
Фиг. 11D



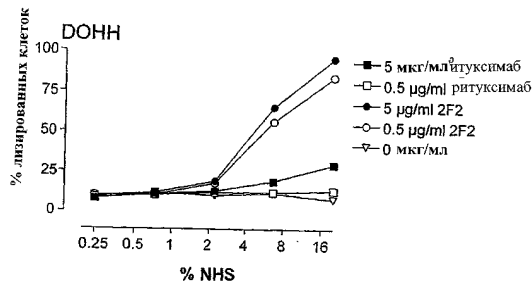
Фиг. 11E



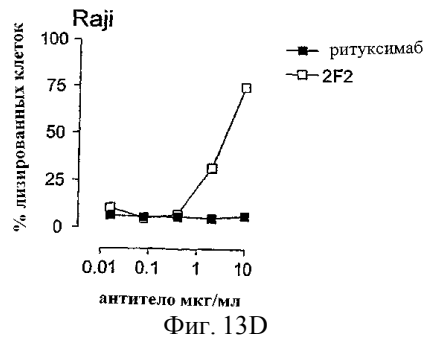
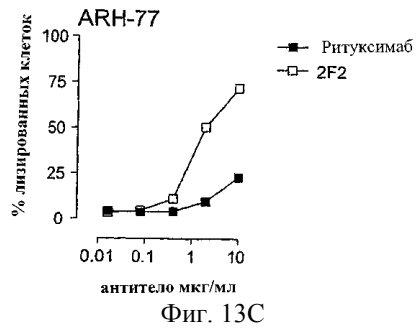
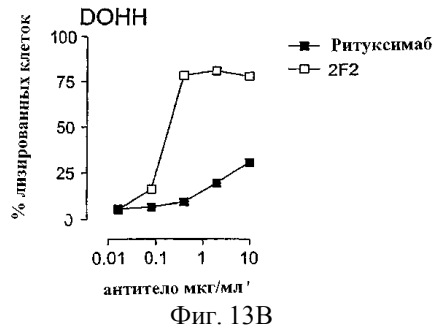
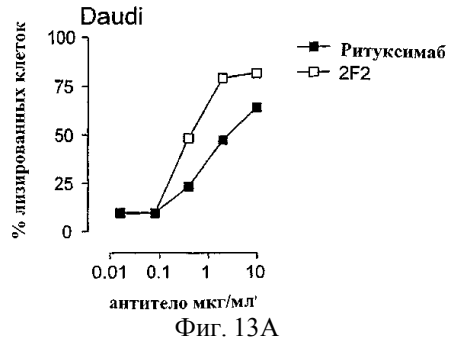
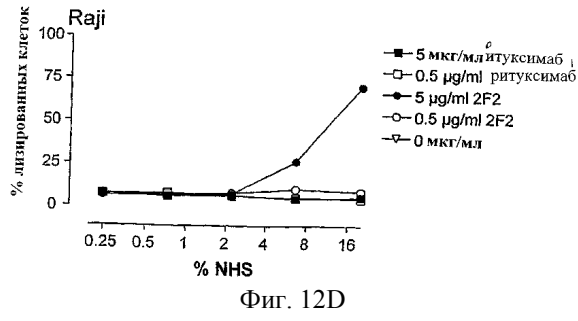
Фиг. 12А

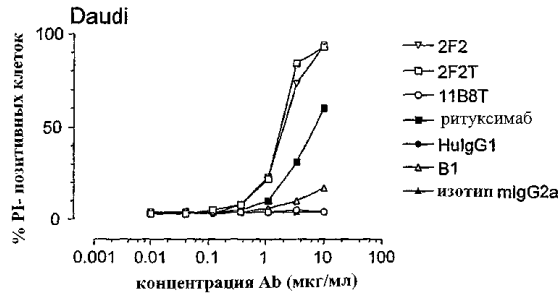


Фиг. 12В

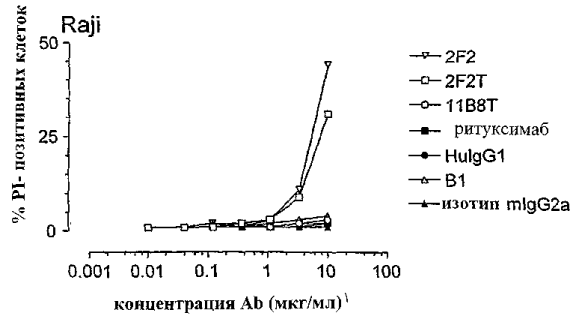


Фиг. 12С

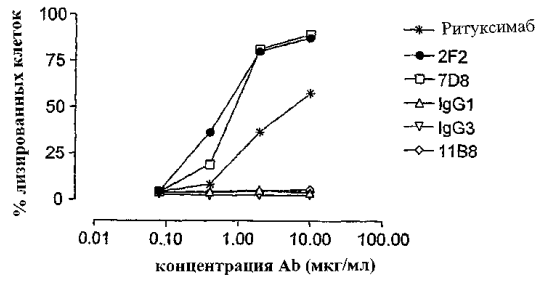




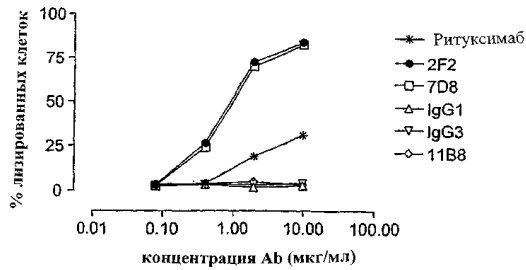
Фиг. 14А



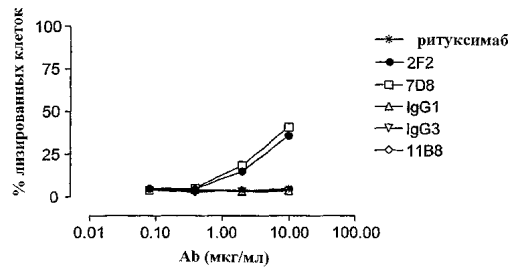
Фиг. 14В



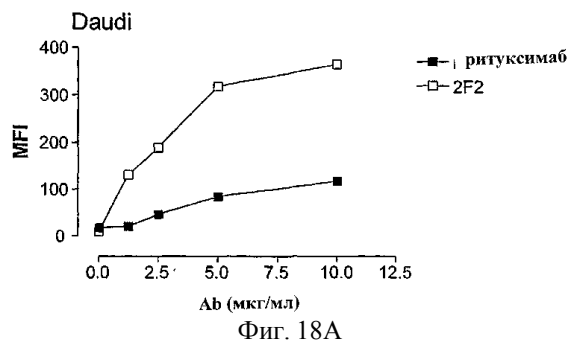
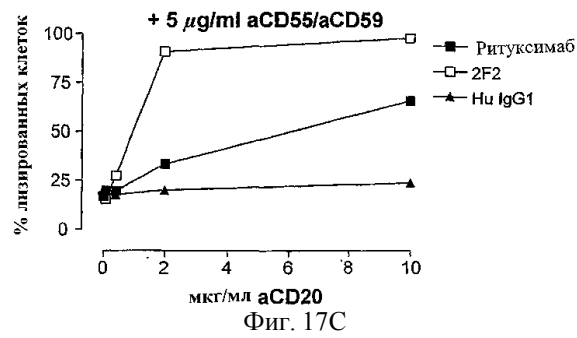
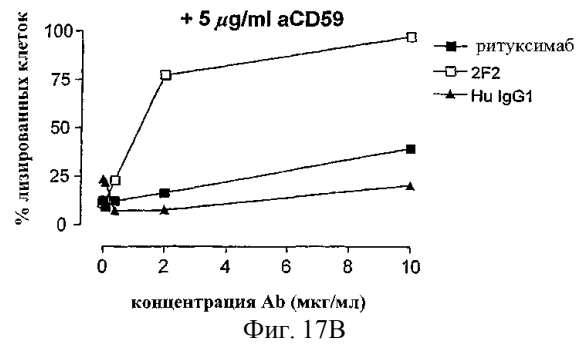
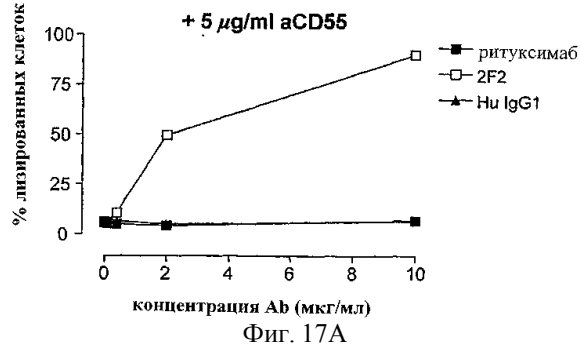
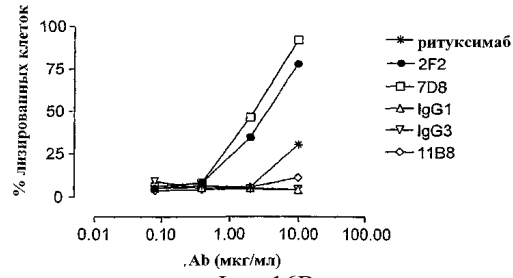
Фиг. 15А

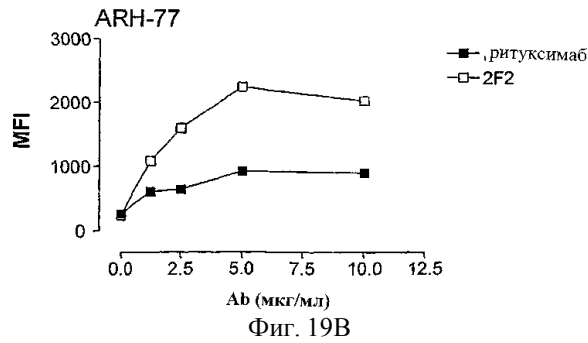
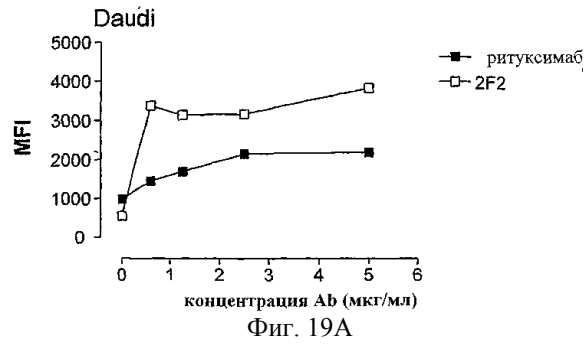
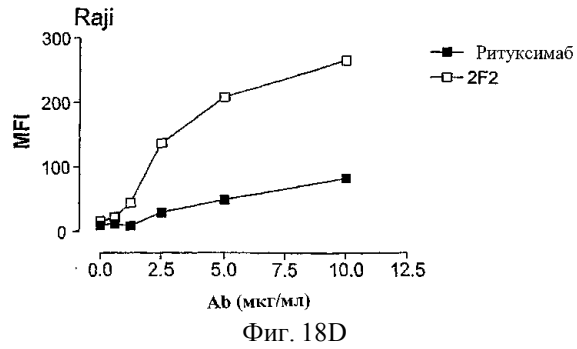
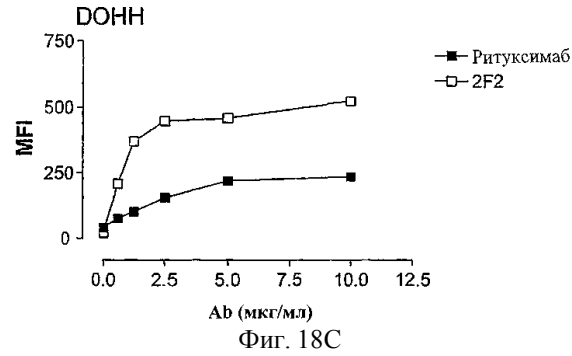
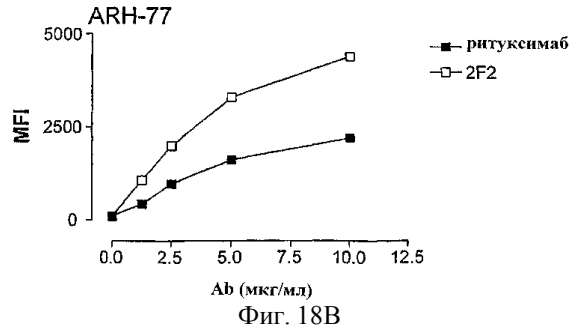


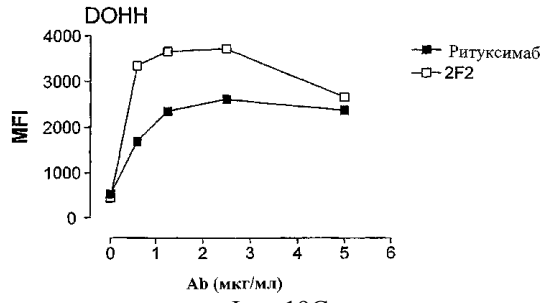
Фиг. 15В



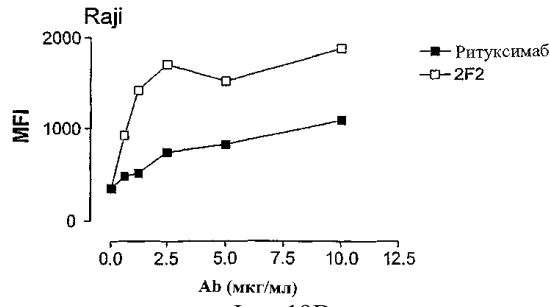
Фиг. 16А



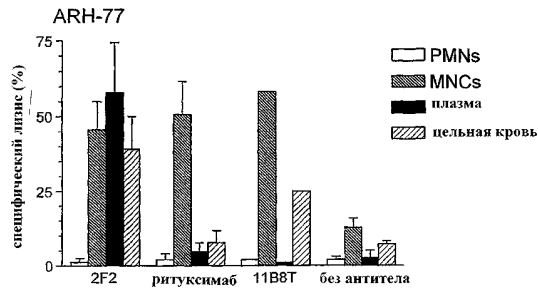




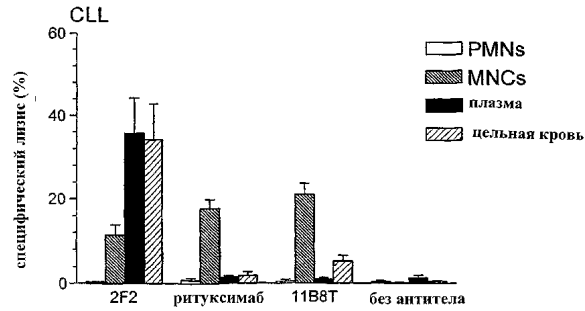
Фиг. 19С



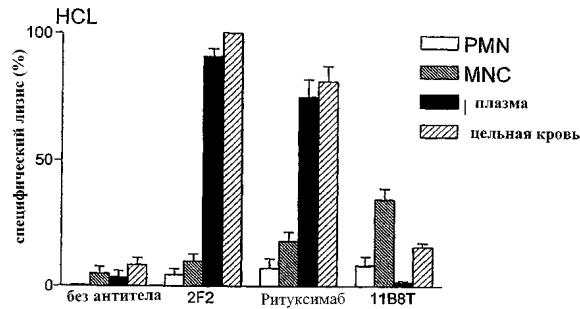
Фиг. 19D



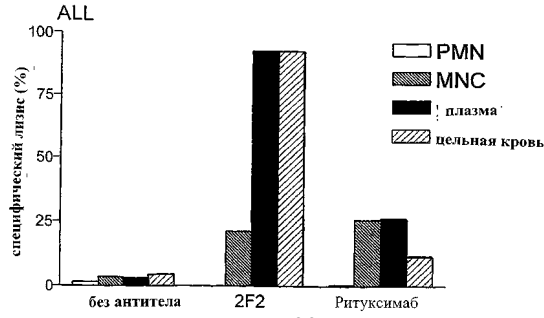
Фиг. 20



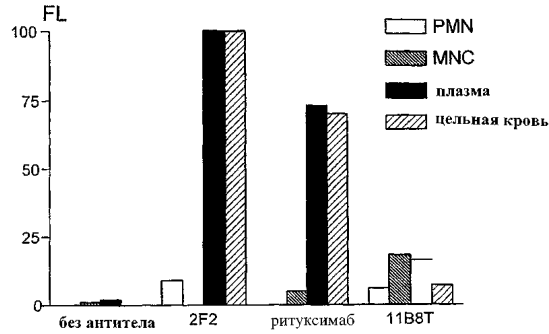
Фиг. 21



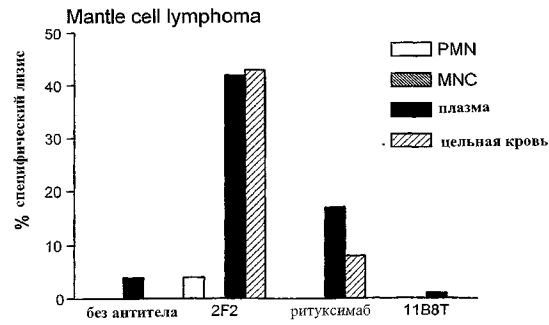
Фиг. 22



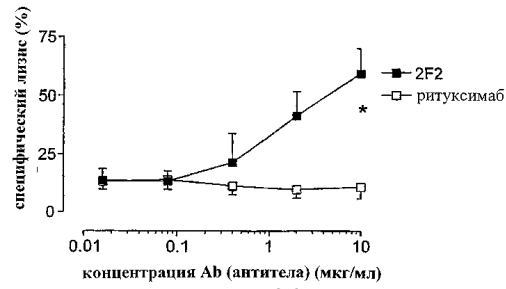
Фиг. 23



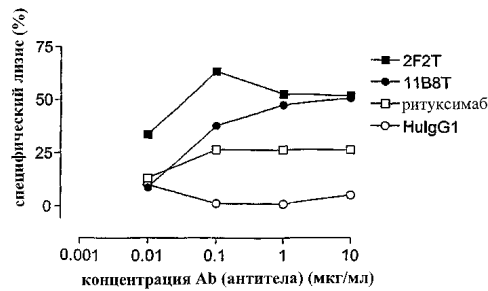
Фиг. 24



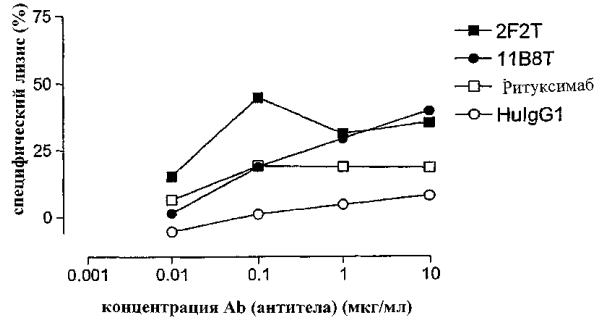
Фиг. 25



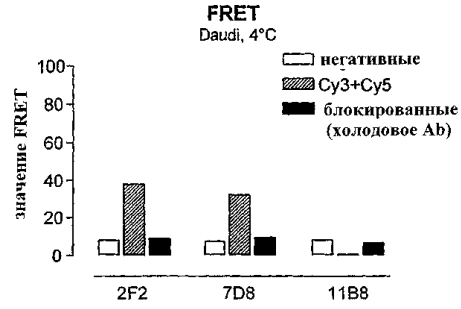
Фиг. 26



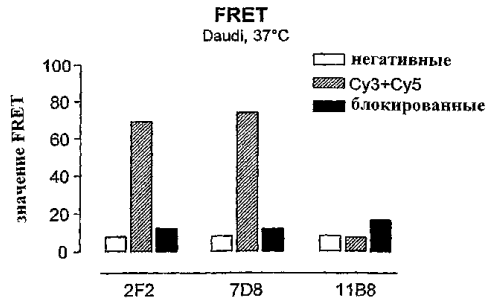
Фиг. 27



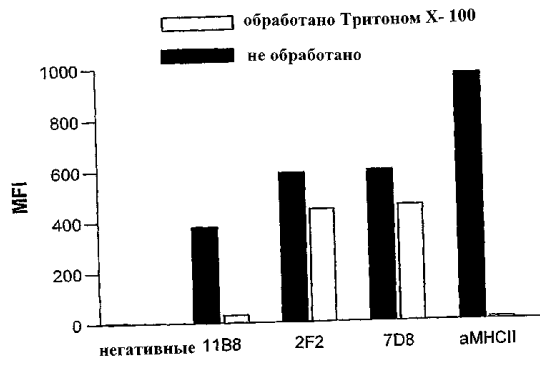
Фиг. 28



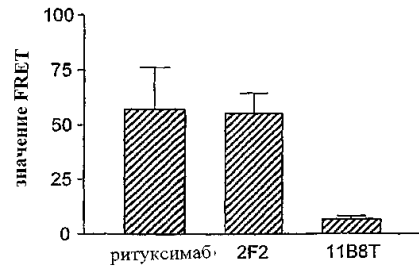
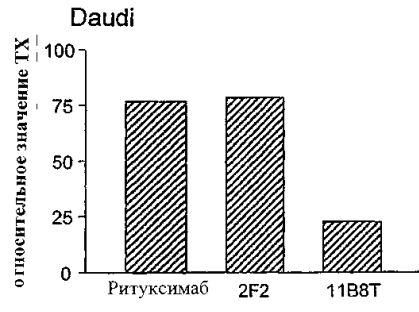
Фиг. 29А



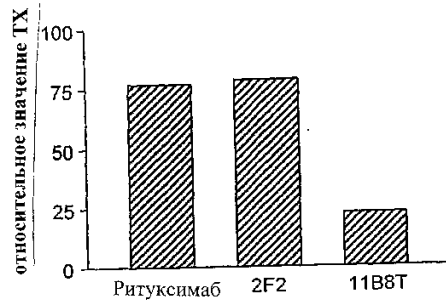
Фиг. 29В



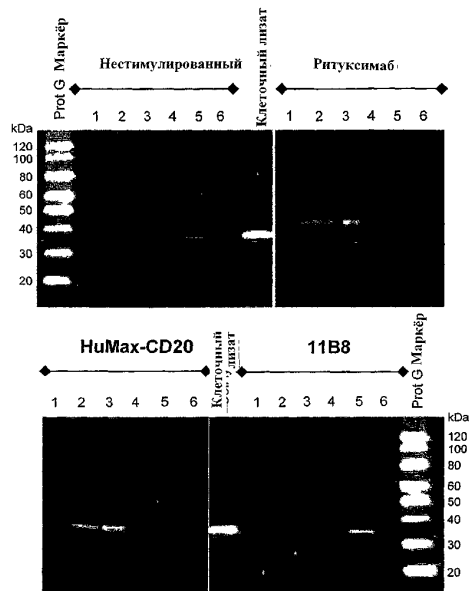
Фиг. 29С



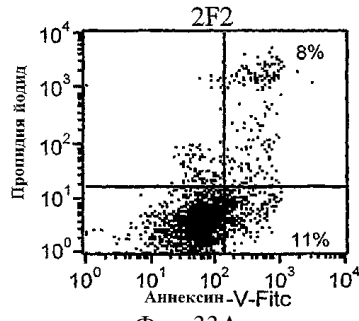
Фиг. 30



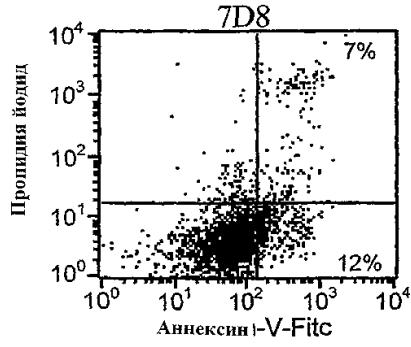
Фиг. 31



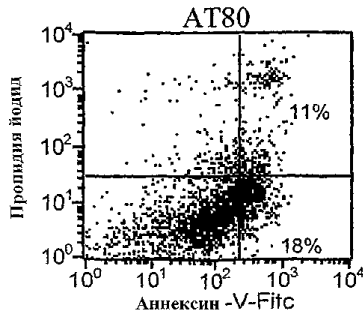
Фиг. 32



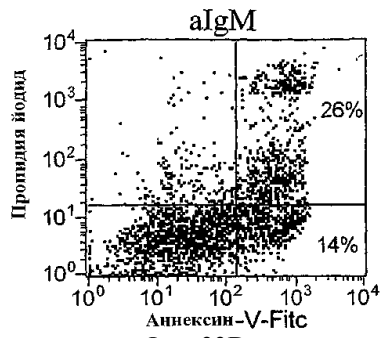
Фиг. 33А



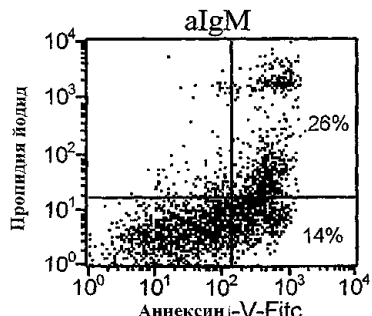
Фиг. 33В



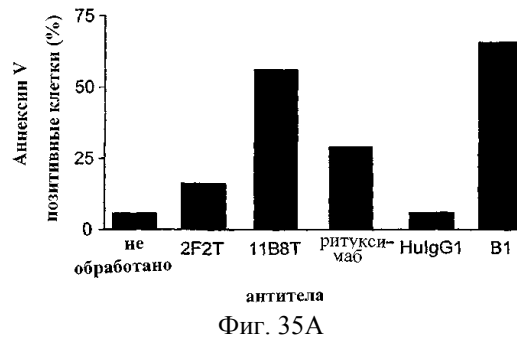
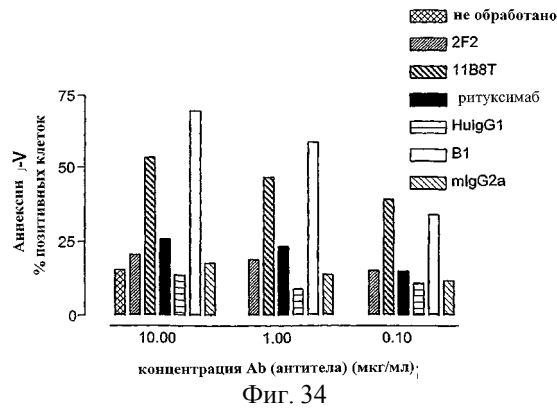
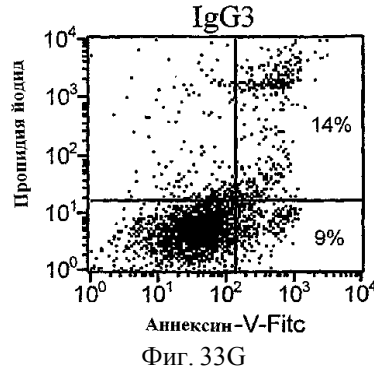
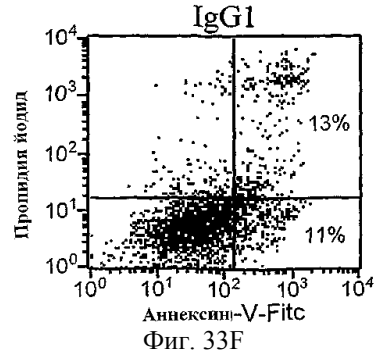
Фиг. 33С

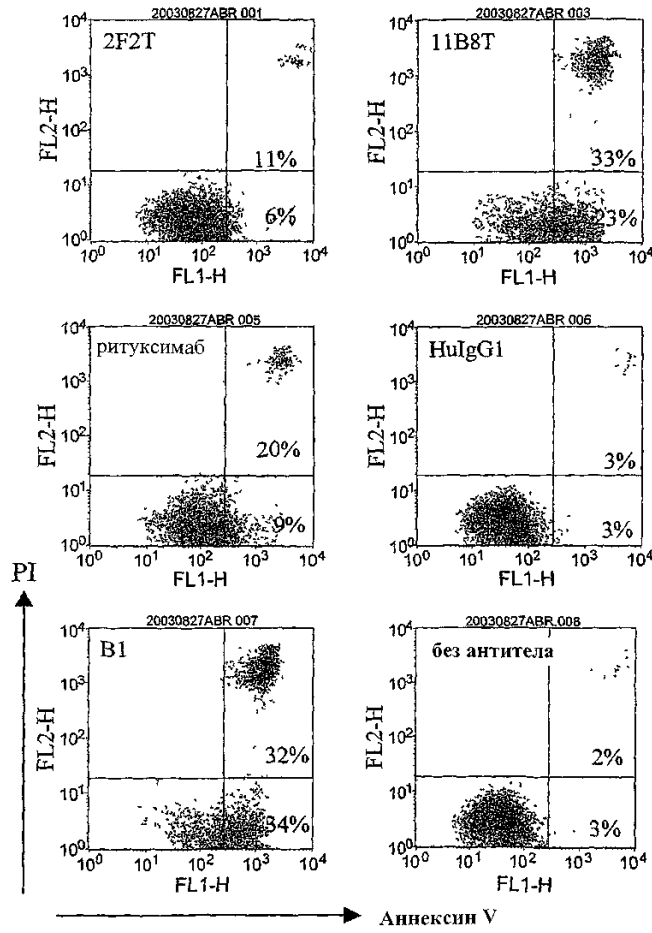


Фиг. 33D



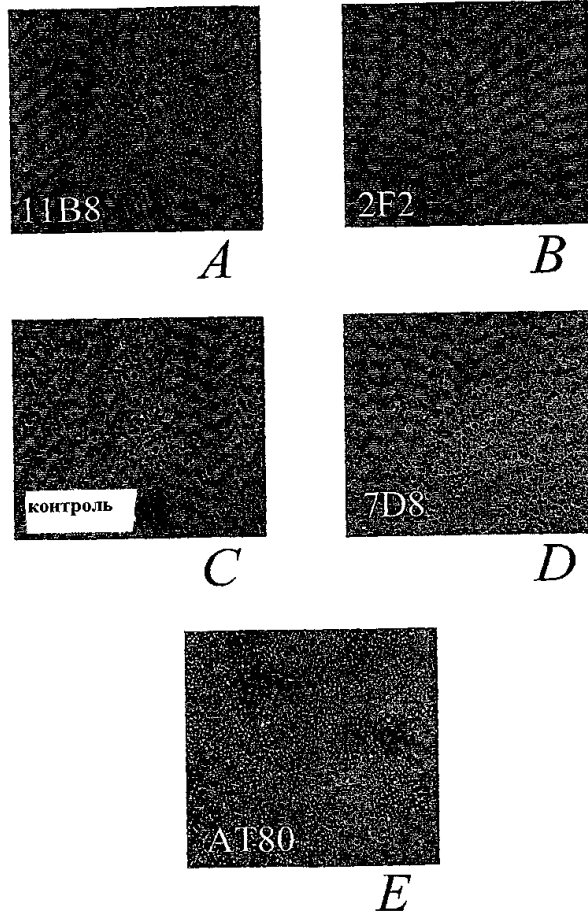
Фиг. 33Е



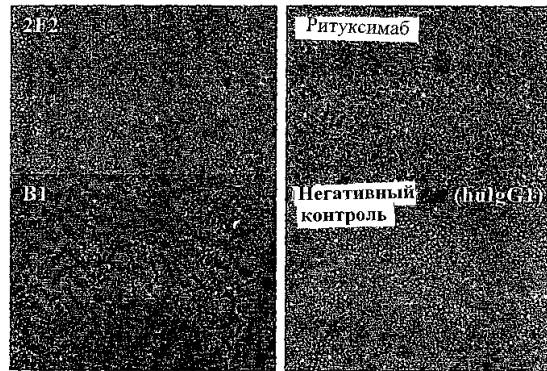


Фиг. 35В

Гомотипическая адгезия клеток Ramos II_S.

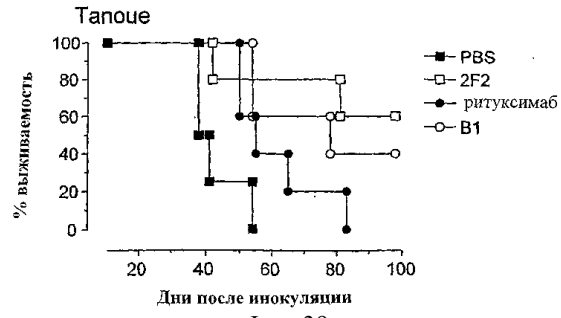


Фиг. 36

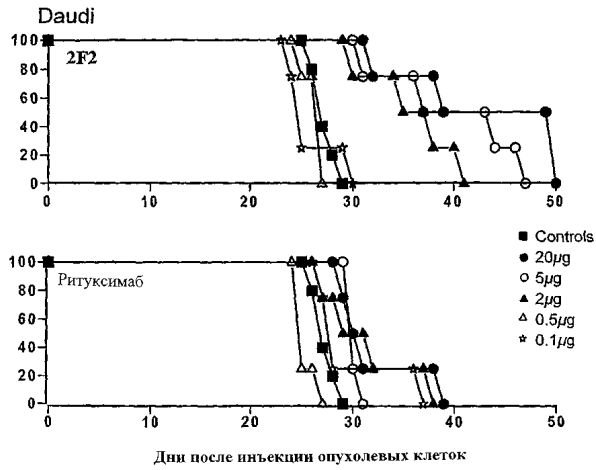


Фиг. 37

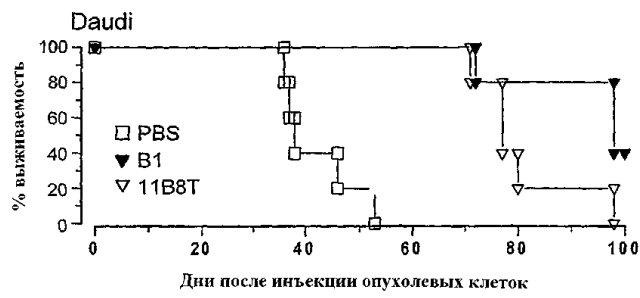




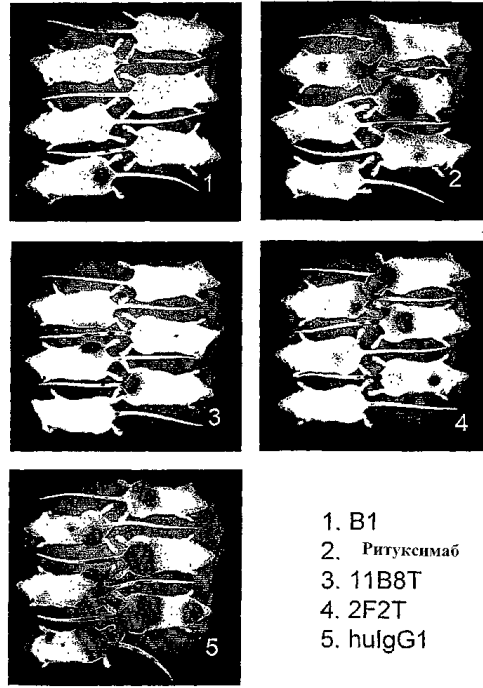
Фиг. 39



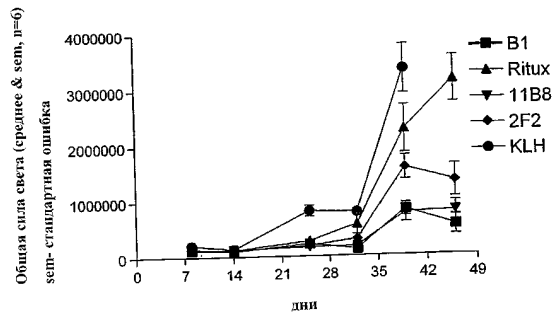
Фиг. 40



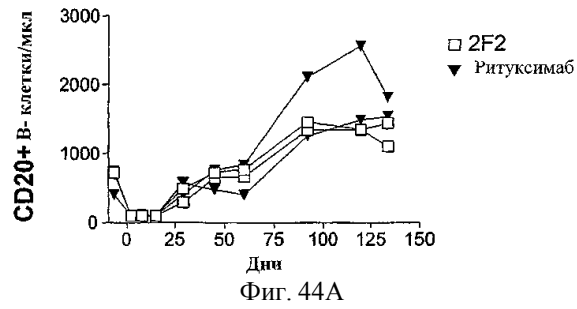
Фиг. 41



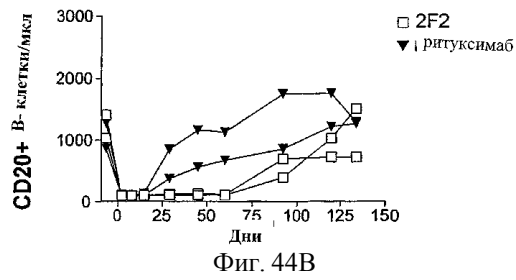
Фиг. 42



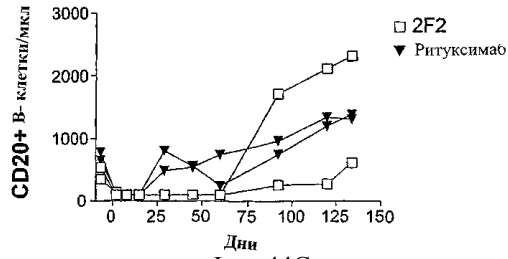
Фиг. 43



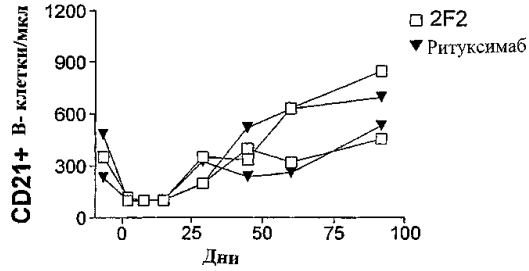
Фиг. 44А



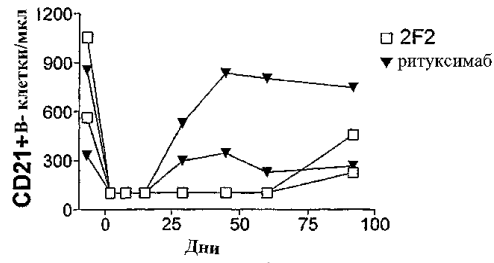
Фиг. 44В



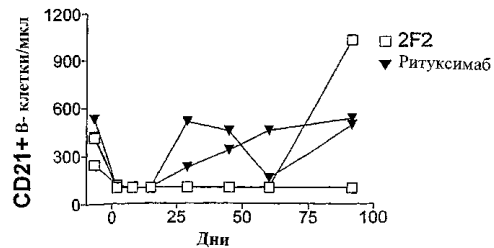
Фиг. 44С



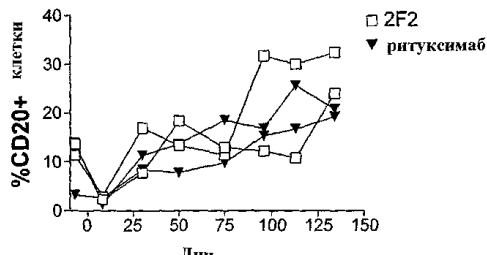
Фиг. 45А



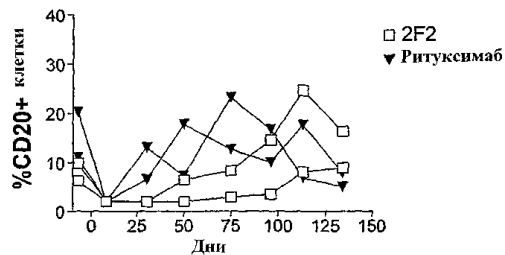
Фиг. 45В



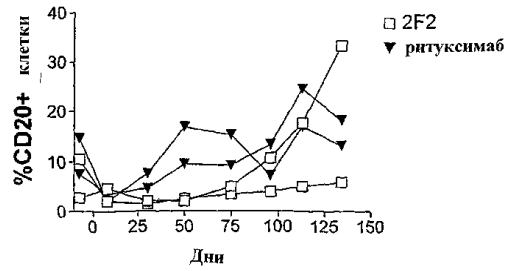
Фиг. 45С



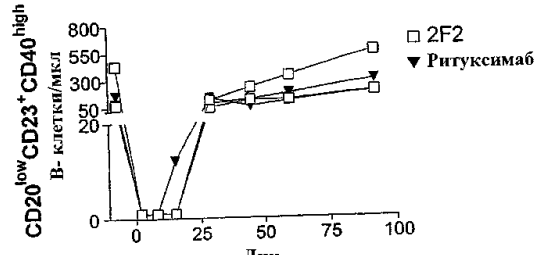
Фиг. 46А



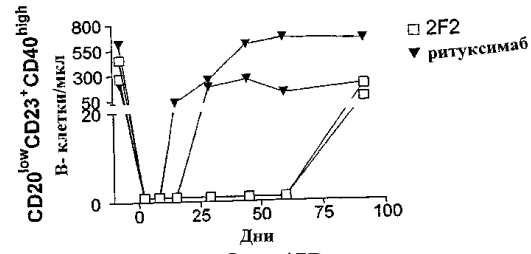
Фиг. 46В



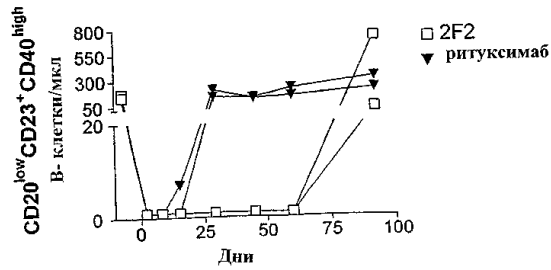
Фиг. 46С



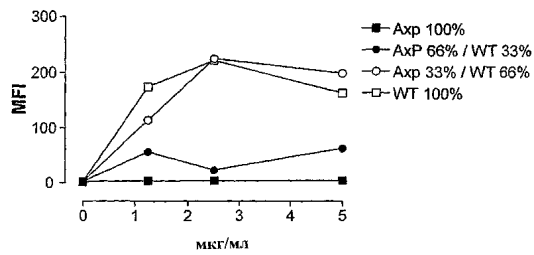
Фиг. 47А



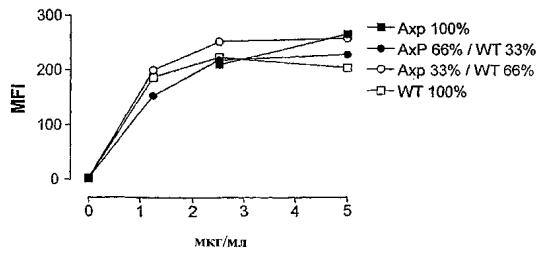
Фиг. 47В



Фиг. 47С

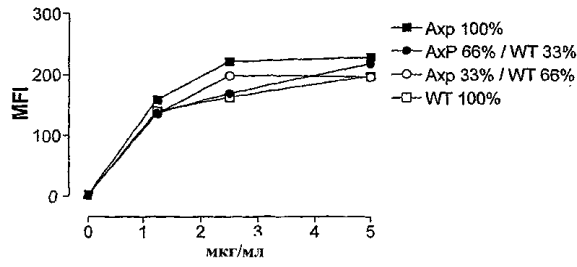


Фиг. 48А

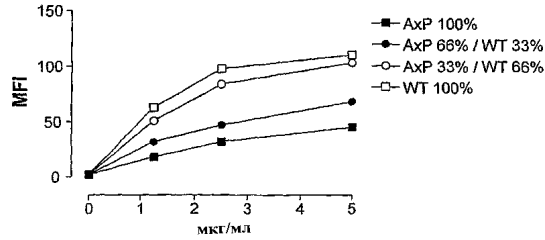


Фиг. 48В

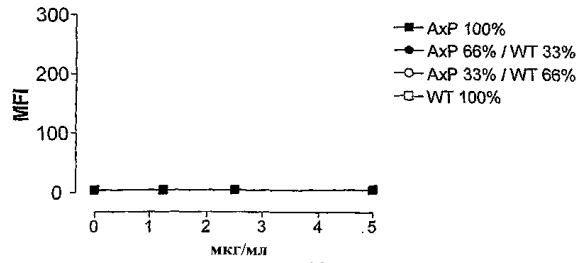
021644



Фиг. 48С

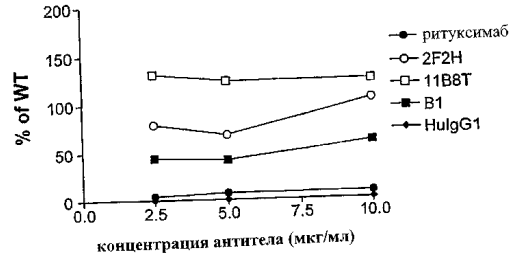


Фиг. 48D



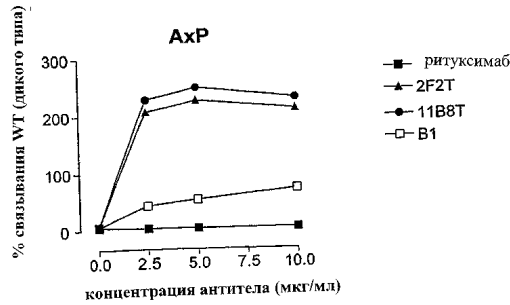
Фиг. 48E

P172S

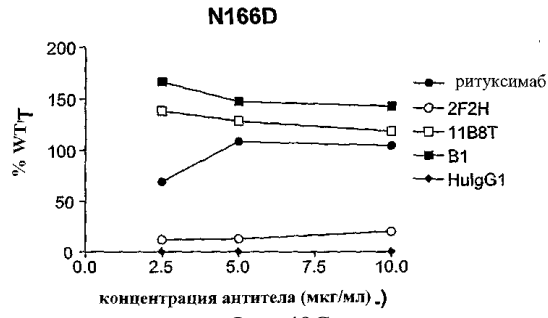


Фиг. 49А

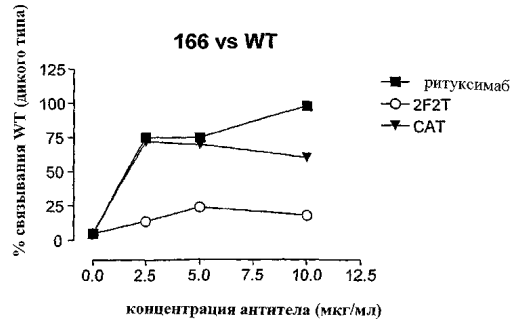
AxP



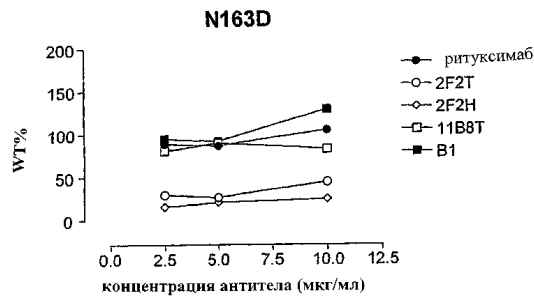
Фиг. 49В



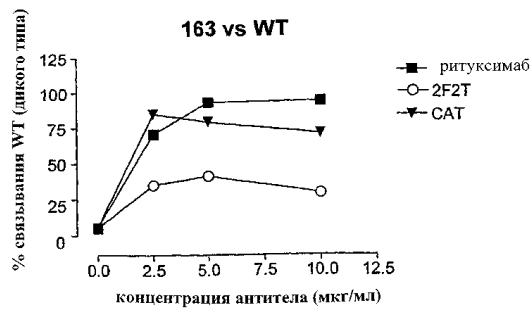
Фиг. 49С



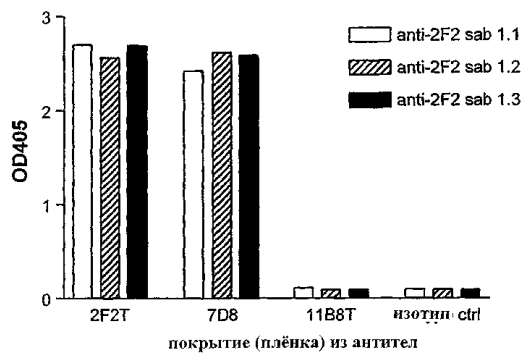
Фиг. 49D



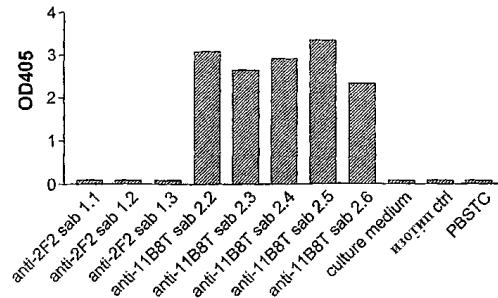
Фиг. 49Е



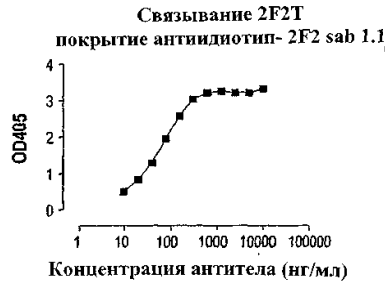
Фиг. 49F



Фиг. 50



Покрывание 2 мкг/мл 1B8T
 Антиидиотипическое антитело 4 мкг/мл
 Фиг. 51



Фиг. 52

Трансляция 2F2 VH

```

1  MFLGLSWIFL LAILKGVQCE VQLVESGGGL VQPGKSLRLS CAASGFTFND
51  YAMHWVRQAP GKGLEWVSTI SWNSGSIGYA DSVKGRFTIS RDNAKKSLYL
101 QMNSLRAEDT ALYYCAKDTQ YGNYYYGMDV WQGGTTVTVS S
    
```

Трансляция 2F2 VL

```

1  MEAPAQLLFL LLLWLPVTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCASQSVS
51  SYLAWYQQKP QAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTSSLEP
101 EDFAVYYVQQ RSNWFLT FGG GTRLEIK
    
```

- CDR1
- CDR2
- CDR3

Фиг. 53

021644

2F2 VH

```

1 ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTTA AAAGGT GTCCAG
55 TGTGAA STGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CCTGGC AGGTCC
109 CTGAGA CTCTCC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT AATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGGAAG GGCCTG GAGTGG GTCTCA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTTCG ATAGGC TATGCG GACTCT GTGAAG GGCCTG TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAG TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCTCC TCAG

```

2F2VL

```

1 ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTCTC TTCCTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55 ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCTCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AACCTT GGCAGG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT CGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTTACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

Фиг. 54

Трансляция 7D8VH

```

1 MELGLSWIFL LALKGVQCE VOLVESGGGL VQDRSLRLS CAASGFTFD
51 YEMHWVRQAP GKLEWVSTI SNNSQTIYA DSVQRFRTIS RDNAKNSLYL
101 QNSLRAEDT ALYYCAKQIQ YGNVYXGMDY WGOGTTVTVS S

```

Трансляция 7D8VL

```

1 MEAPAQLLFL LLLWLPDTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
51 SYLAWYQOKP QAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTSSLEP
101 EDFAVYYCC RSDWELTFGG GTRLEIK

```

- CDR1
- CDR2
- CDR3

Фиг. 55

7D8VH

```

1 ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTTA AAAGGT GTCCAG
55 TGTGAA STGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CCTGAC AGGTCC
109 CTGAGA CTCTCC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT CATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGGAAG GGCCTG GAGTGG GTCTCA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTACC ATAGGC TATGCG GACTCT GTGAAG GGCCTG TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAG TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCTCC TCAG

```

7D8VL

```

1 ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTCTC TTCCTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55 ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCTCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AACCTT GGCAGG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT AGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTTACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

Фиг. 56

Трансляция VHCD2011B8

```

1 MELGLSWWFL VAILKGVQCE VOLVQSGGGL VHPGGSRLRLS CTGSGFTFSY
51 YEMHWVRQAP GKLEWVSTI GTGGVTYAD SVKQRFRTISR DNVKNSLYLQ
101 MNSLRAEDMA VYYCARQYK ACSEYDGLYGMDVWGOGTTV TVSS

```

Трансляция VLCD2011B8

```

1 MEAPAQLLFL LLLWLPDTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
51 SYLAWYQOKP QAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTSSLEP
101 EDFAVYYCC RSDWELTFGG GTRLEIK

```

- CDR1
- CDR2
- CDR3

Фиг. 57

021644

VHCD2011B8

```
1. ATGGAG TTGGGG CTGAGC TGGGTT TTCCTT GTTCCT ATATTA AAAGGT GTCCAG
55. TGTGAG GTTCAG CTGGTG CAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAT CCTGGG GGGTCC
109. CTGAGA CTCTCC TGTACA GGCTCT GGATTC ACCTTC AGTTAC CATGCT ATGCAT
163. TGGGTT CGCCAG GCTCCA GGAAAA GGCTCG GAATGG GTATCA ATTATT GGGACT
217. GGTGGT STCACA TACTAT GCAGAC TCCGTG AAGGGC CGATTC ACCATC TCCAGA
271. GACBAI STCAGS AACTCC TTGTAT CTICAA ATGAAC AGCCTG AGAGCC GAGGAC
325. ATGGCT GTGTAT TACTGT GCAAGA GATTAC TATGGT GCGGGG AGTTTT TATGAC
379. GGCCTC TACGGT ATGGAC GTCTGG GGCCAA GGGACC ACGGTC ACCGTC TCCTCA
433. G
```

VLCD2011B8

```
1. ATGGAA GCCCCA GCACAG CTCTCC TTCCTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55. ACCGGA GAABTT GTGTTC ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCGGGG
109. GAAAGA GCCACC CTCTCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163. TGGTAC CAACAG ABAOCT GGCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217. AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTG AGTGGC AGTGGG TGTGGG ACAGAC
271. TTCCTT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTIGCA GTTTAT TACTGT
325. CAGCAG CGTAGC GACTGG CCGCTC ACTTTC GCGGGA GGGACC AAGGTG GAGATC
379. AAAC
```

Фиг. 58



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2