



(51) МПК

*C07K 16/18* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)*A61P 7/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003114744/13, 22.10.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
22.10.2001(30) Конвенционный приоритет:  
20.10.2000 (п.1-37) JP 2000-321821  
12.09.2001 (п.38) JP 2001-277314

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2004

(45) Опубликовано: 20.11.2006 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 5885574 A, 23.03.1999. WO 00/53634  
A, 14.09.2000. EP 1035132 A, 13.09.2000.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
20.05.2003(86) Заявка РСТ:  
JP 01/09259 (22.10.2001)(87) Публикация РСТ:  
WO 02/33072 (25.04.2002)Адрес для переписки:  
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО  
"Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву

(72) Автор(ы):

ЦУТИЯ Масаюки (JP),  
ОХТОМО Тосихико (JP),  
ЯБУТА Наохиро (JP),  
ЦУНОДА Хироюки (JP),  
ОРИТА Тецуро (JP)

(73) Патентообладатель(и):

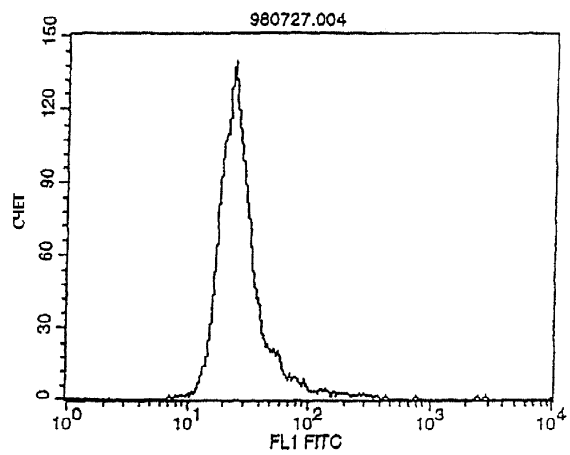
ТУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

## (54) ДЕГРАДИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО, ЯВЛЯЮЩЕЕСЯ АГОНИСТОМ ТРО

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в медицинской практике. Модифицированное антитело по изобретению содержит две или более V-области Н-цепи и две или более V-области L-цепи антитела, соединенные напрямую или через линкер ковалентной или нековалентной связью. Антитело имеет меньший размер по сравнению с исходным антителом, обладающим или по существу не обладающим агонистическим действием к рецептору ТРО. Антитело по изобретению является агонистом ТРО, способно специфически распознавать и поперечно сшивать рецептор ТРО. Для индукции агонистического действия в клетках,

экспрессирующих рецептор ТРО, клетки контактируют с модифицированным антителом. Измерение ТРО-агонистического действия антитела осуществляют по поперечной сшивке рецептора ТРО. Модифицированное антитело может быть использовано в качестве лекарственного средства для лечения тромбоцитопении. Модифицированные антитела обладают более высокой активностью, чем цельные антитела (IgG), и благодаря уменьшенным молекулярным размерам и отсутствию константных областей они обладают улучшенной проникающей способностью в ткани. 5 н. и 33 з.п. ф-лы, 59 ил., 3 табл.



ФИГ. 1

RU 2 2 8 7 5 3 4 C 2

RU 2 2 8 7 5 3 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)*A61P 7/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2003114744/13, 22.10.2001**(24) Effective date for property rights: **22.10.2001**(30) Priority:  
**20.10.2000 (cl.1-37) JP 2000-321821**  
**12.09.2001 (п.38) JP 2001-277314**(43) Application published: **27.11.2004**(45) Date of publication: **20.11.2006 Bull. 32**(85) Commencement of national phase: **20.05.2003**(86) PCT application:  
**JP 01/09259 (22.10.2001)**(87) PCT publication:  
**WO 02/33072 (25.04.2002)**Mail address:  
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO**  
**"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu**

(72) Inventor(s):

**TsUTIJa Masajuki (JP),**  
**OKhTOMO Tosikhiko (JP),**  
**JaBUTA Naokhiro (JP),**  
**TsUNODA Khirojuki (JP),**  
**ORITA Tetsuro (JP)**

(73) Proprietor(s):

**TUGAI SEJJaKU KABUSIKI KAJSJa (JP)**(54) **DEGRADED ANTIBODY AS TPO AGONIST**

(57) Abstract:

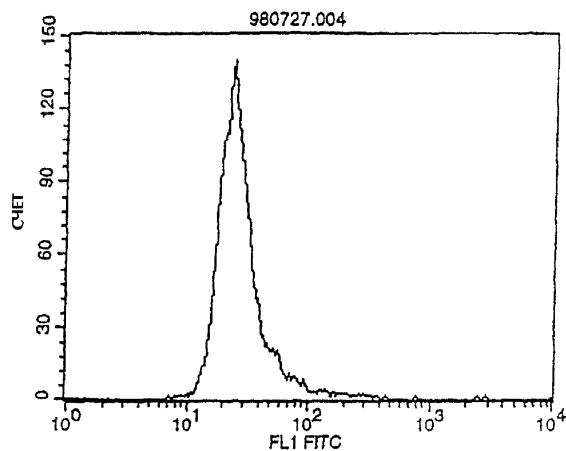
FIELD: biotechnology, medicine, immunology.

SUBSTANCE: invention relates to a modified antibody comprising two or more V-regions in H-chain and two or more V-regions in L-chain of antibody bound directly or over a linker by covalent or noncovalent bond. Antibody has a lesser size as compared with the parent antibody possessing or not possessing the agonistic effect to TPO receptors. Antibody represents TPO agonist and able for specific recognizing and cross-linking the TPO receptor. For induction of the agonistic effect in cells expressing TPO receptors cells are contacted with the modified antibody. Measurement of the antibody TRO-agonistic effect is carried out by cross-linking TRO receptors. The modified antibody can be used as a medicinal agent in treatment of thrombocytopenia. Modified antibodies possess higher activity as compared whole antibodies (JgG) and improved penetration capacity into tissues owing to decreased molecular sizes and

absence of constant regions.

EFFECT: improved and valuable properties of antibody.

38 cl, 92 dwg, 3 tbl, 8 ex

**ФИГ. 1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к модифицированным антителам, содержащим две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела, которые проявляют ТРО-агонистическую активность путем поперечного сшивания ТРО-рецептора.

5 Модифицированные антитела обладают активностью ТРО-агонистов, трансдуцируя сигнал в клетки путем поперечного сшивания ТРО-рецептора, и могут применяться как лекарственные средства в различных целях.

Уровень техники

10 Открытый в 1994 г. тромбопоэтин (ТРО) представляет собой фактор, регулирующий образование тромбоцитов, и, как известно, состоит из гликопротеина с молекулярной массой 70-80 тыс. Да и вырабатывается главным образом в печени. Тромбопоэтин - это цитокин, помогающий клеткам предшественника тромбоцитов в костном мозге выживать, размножаться, дифференцироваться и созревать, то есть он стимулирует дифференцировку и пролиферацию мегакариоцитов. Рецептор тромбопоэтина (ТРО) был  
15 идентифицирован ранее ТРО как с-Mpl, рецептор специфического фактора регуляции образования тромбоцитов (M. Souyri et al., Cell 63: 1137 (1990)). Как сообщалось, с-Mpl распространен преимущественно в клетках предшественника тромбоцитов, мегакариocyтах, и в клетках тромбоцитов, и подавление экспрессии с-Mpl избирательно тормозит образование мегакариocyтов (M. Methia et al., Blood 82: 1395 (1993)).  
20 Сообщение о том, что лигандом к с-Mpl является ТРО, основывалось на результатах анализа пролиферации клеток, специфичных к лиганду к с-Mpl, и очистки лиганда с использованием с-Mpl (F. De Sauvage et al., Nature 369: 533 (1994); TD. Bartley et al., Cell 77: 1117 (1994)). В настоящее время Mpl называют ТРО-рецептором. Как полагают, агонисты ТРО и ТРО-рецептора могут быть применены, таким образом, в  
25 качестве терапевтического средства против тромбоцитопении, например, как лекарственный препарат, снижающий тромбоцитопению, вызванную подавлением костного мозга или резекцией костного мозга при лечении больных раком.

Помимо этого, разрабатывались модифицированные антитела, в частности антитела с  
30 уменьшенными размерами молекулы, как, например, одноцепочечные Fv, для улучшения проникающей способности в ткани и опухоли за счет уменьшения размера молекул и которые можно было бы получать рекомбинантным способом. В последнее время димеры одноцепочечных Fv, особенно биспецифичные димеры, используют для наглядного сшивания клеток. Типичными примерами подобных димеров являются гетеродимеры одноцепочечных Fv, распознающие антигены раковых клеток и антигены клеток-хозяина,  
35 например, NK клеток (естественные киллеры) и нейтрофилов (Kipriyanov et al., Int. J. Cancer, 77, 9763-9772, 1998). Их получают методами конструирования из одноцепочечных Fv в виде модифицированных антител, которые более эффективны при лечении разновидностей рака путем индуцирования поперечного межклеточного сшивания. Как полагают, образование межклеточных поперечных сшивок индуцируется антителами и их  
40 фрагментами (например, Fab-фрагментом), биспецифичными модифицированными антителами и даже димерами одноцепочечных Fv, которые сами по себе моноспецифичны.

Примеры антител, о которых известно, что они способны трансдуцировать сигнал путем образования поперечных сшивок поверхностных молекул/молекулы клетки, включают такие как антитело к EPO-рецептору, участвующему в дифференцировке и пролиферации (JP-A  
45 2000-958000), антитело к MuSK-рецептору (Xie et al., Nature Biotech. 15, 768-771, 1997) и др. Известно также антитело-агонист к рецептору ТРО, его фрагменты и одноцепочечные Fvs (WO 99/17364). Однако никаких сведений о том, что димеры одноцепочечных Fv и такие модифицированные антитела, как одноцепочечные бивалентные антитела, обладают агонистической активностью, не приводилось.

50 Обратив внимание на тот факт, что мономеры одноцепочечных Fv, происходящие от моноклональных антител (антитело MABL-1 и антитело MABL-2, полученные авторами настоящего изобретения), индуцирующих апоптоз IAP-содержащих клеток, не индуцируют апоптоз клеток, а димеры индуцируют апоптоз, авторы изобретения открыли, что димеры

поперечно сшивают (димеризируют) IAP-рецептор на клеточной поверхности и таким путем сигнал трансдуцируется в клетки, что в итоге приводит к индуцированию апоптоза. Это дало основание предположить, что димеры моноспецифичных одноцепочечных Fv поперечно сшивают молекулу/молекулы на поверхности клетки (т.е. рецептор) и

5 трандуцируют сигнал, подобно лиганду, функционируя таким образом как агонисты.

Сосредоточив свое внимание на образовании межклеточных поперечных сшивок, авторы обнаружили, что вышеуказанные димеры одноцепочечных Fv не вызывают

гемагглютинации, в то время как вышеуказанные моноклональные антитела вызывают ее. Такие же результаты были получены и для одноцепочечных двухвалентных антител

10 (одноцепочечные полипептиды, содержащие две V-области H-цепи и две V-области L-цепи). Из этого следовало, что моноклональные антитела могут образовывать

межклеточные поперечные сшивки, тогда как модифицированные антитела типа димеров одноцепочечного Fv и одноцепочечных двухвалентных антител, поперечно сшивают молекулу/молекулы поверхности клетки, однако межклеточных поперечных сшивок не

15 образуют.

Основываясь на данных наблюдениях, авторы настоящего изобретения впервые обнаружили, что такие модифицированные антитела, как димеры одноцепочечных Fv и одноцепочечные бивалентные антитела, поперечно сшивают молекулу/молекулы на поверхности клетки или же внутриклеточную молекулу/молекулы той же клетки, помимо уже

20 известного межклеточного поперечного сшивания, и что они приемлемы в качестве лигандов к молекуле/молекулам (в частности, в качестве лиганда, имитирующего действие естественного лиганда).

Обнаружив помимо этого, что молекулу антитела (цельный IgG) можно модифицировать в димеры одноцепочечного Fv, одноцепочечные бивалентные антитела и т.п., которые

25 образуют поперечные сшивки молекулы/молекул поверхности клетки, уменьшая тем самым нежелательные последствия межклеточного поперечного сшивания и обеспечивая новые лекарственные средства, оказывающие только желательное воздействие на клетку, авторы таким образом завершили свое изобретение. Модифицированные антитела настоящего изобретения обладают значительно более высокой активностью, чем цельные антитела

30 (IgG), содержащие ту же самую V-область, что и модифицированные антитела. Благодаря уменьшенным, по сравнению с молекулами антител, молекулярным размерам и благодаря отсутствию у них константных областей, они обладают улучшенной проникающей способностью в ткани.

Сущность изобретения

35 Целью настоящего изобретения является получение модифицированных антител-агонистов с уменьшенным размером молекулы, содержащих две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи моноклонального антитела и проявляющих ТРО-агонистическую активность путем поперечного сшивания ТРО-рецептора.

Таким образом, настоящее изобретение относится к модифицированным антителам, содержащим две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи,

40 предпочтительно от 2 до 6 каждой, особенно предпочтительно от 2 до 4 каждой, наиболее предпочтительно по две каждой, и проявляющим активность как ТРО-агонисты путем поперечного сшивания ТРО-рецептора.

"Модифицированные антитела" в настоящем описании означают любое вещество, содержащее две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи, в котором

45 вышеозначенные V-области связаны напрямую или же через линкер с помощью ковалентной или нековалентной связи. Например, полипептиды и соединения, полученные соединением каждой V-области антитела через пептидный линкер или с помощью химического поперечносшивающего агента или т.п. Две или более V-области H-цепи и две

50 или более V-области L-цепи, используемые в настоящем изобретении, могут быть производными одного и того же антитела или же разных антител.

Модифицированными антителами, согласно настоящему изобретению, могут быть любые вещества, пока они сохраняют способность специфического распознавания и

поперечного сшивания TPO-рецептора и таким образом могут трансдуцировать сигнал в клетки. Сюда входят модифицированные антитела, полученные дальнейшей модификацией одной из частей аминокислотной последовательности V-области модифицированных антител.

5 Предпочтительными примерами модифицированных антител по настоящему изобретению являются такие мультимеры, как димеры, тримеры и тетрамеры одноцепочного Fv, содержащие V-область H-цепи и V-область L-цепи, или одноцепочечные полипептиды, содержащие две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи. Для случаев, когда модифицированные антитела по настоящему изобретению  
10 являются мультимерами одноцепочного Fv, например димерами, тримерами, тетрамерами и т.п., содержащими V-область H-цепи и V-область L-цепи, предпочтительно, чтобы V-область H-цепи и V-область L-цепи, присутствующие в одной и той же цепи, не были бы соединены таким образом, чтобы образовывать антигенсвязывающий центр.

Более предпочтительными примерами являются димеры одноцепочечного Fv,  
15 содержащего V-область H-цепи и V-область L-цепи, или одноцепочечный полипептид, содержащий две V-области H-цепи и две V-области L-цепи. Предпочтительно, чтобы V-область H-цепи и V-область L-цепи в этих модифицированных антителах были соединены через линкер.

Примеры вышеуказанного мультимера одноцепочечного Fv включают мультимеры с  
20 нековалентной связью, мультимеры с ковалентной связью, полученные при помощи поперечносшивающего радикала, и мультимеры, полученные посредством поперечносшивающего реагента (антитела, фрагмента антитела или двухвалентного модифицированного антитела). В качестве поперечносшивающих радикалов для образования мультимера могут быть использованы стандартные поперечносшивающие  
25 радикалы, применяемые для поперечной сшивки пептидов. В качестве примера можно привести дисульфидную мостиковую связь по остаткам цистеина, другие поперечносшивающие радикалы, например C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> алкилен (т.е. тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен, гептаметилен и октаметилен и т.д.), или C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен (цис-/транс-3-бутенилен, цис-/транс-2-пентенилен, цис-/транс-3-пентенилен, цис-/транс-3-гексенилен и т.д.).

Кроме того, таким поперечносшивающим реагентом, который может соединяться с  
одноцепочечным Fv, является, например, аминокислотная последовательность, которую можно необязательно вводить в Fv, например, антитело к FLAG-последовательности или подобной или его фрагмент или модифицированное антитело, происходящее из антитела,  
35 например одноцепочечный Fv.

"TPO-агонистическое действие" в настоящем описании обозначает биологическое действие, протекающее в клетке/клетках, сигнал в которую/которые трансдуцируется путем поперечного сшивания TPO-рецептора, например, пролиферация, дифференцировка или стимуляция роста мегакариоцитов или образование тромбоцитов.

40 ED50 TPO-агонистического действия, согласно изобретению, определяют общепринятыми для измерения агонистического действия способами. Примеры методов такого измерения включают анализ клеточной пролиферации с применением клеточных линий, чувствительных к TPO, типа BaF/mp1 или UT7/TPO; измерение фосфорилирования белка MPL; анализ дифференциации колонии мегакариоцитов из клеток костного мозга;  
45 анализ восстановительного синтеза в тромбоцитах мышей *in vivo*; измерение индукции экспрессии тромбоцитарного антигена GPIIb/IIIa (анти-GPIIb/IIIa) с использованием линии мегакариобластных клеток лейкемии человека (CMK) или измерение индукции полиплоидии клеточной линии мегакариобластов (DAMI). ED50 - это доза, необходимая для достижения 50% реакции по отношению к максимуму активности, принятому за 100% на кривой "доза-реакция".  
50

Предпочтительные модифицированные антитела по настоящему изобретению обладают TPO-агонистическим действием (ED50), равным или же большим, чем у антитела с той же антигенсвязывающей областью, как у модифицированного антитела, то есть, чем у целого

антитела (далее по тексту "исходное антитело"), например IgG, имеющего ту же пару V-области H-цепи и V-области L-цепи, что и пара V-области H-цепи и V-области L-цепи, образующая антигенсвязывающую область модифицированного антитела. Более предпочтительными являются модифицированные антитела, у которых ТРО-агонистическое действие (ED50) более чем в два раза выше, чем у исходного антитела, еще более предпочтительны модифицированные антитела с более чем 5-кратным превышением, наиболее предпочтительны с более чем 10-кратным превышением.

Настоящее изобретение относится к модифицированным антителам с ТРО-агонистическим действием, содержащим V-область H-цепи и V-область L-цепи, образующие такую же антигенсвязывающую область, как и исходное антитело, которое связывается с ТРО-рецептором, однако не обладает ТРО-агонистическим действием в отношении молекулы.

Соединения, содержащие две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи по настоящему изобретению, - это любые соединения, которые содержат две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела и оказывают ТРО-агонистическое действие (ED50), равное или лучшее, чем у тромбопоэтина (ТРО). Предпочтительными являются такие, у которых ТРО-агонистическое действие (ED50) выше, чем у ТРО, более чем в два раза, более предпочтительны с более чем 5-кратным превышением, наиболее предпочтительны с более чем 10-кратным превышением.

Упомянутые здесь "соединения" включают не только модифицированные антитела по изобретению, но также и любые соединения, содержащие две или более, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4, наиболее предпочтительно 2, антигенсвязывающие области, такие, как целые антитела или  $F(ab')_2$ .

У предпочтительных модифицированных антител или соединений по настоящему изобретению, содержащих две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела, межклеточное адгезионное действие (ED50) не превышает 1/10 сравнительно с исходным антителом, у более предпочтительных сколько-нибудь существенное межклеточное адгезионное действие отсутствует.

Вышеуказанное ED50 межклеточного адгезионного действия определяется стандартными способами измерения межклеточного адгезионного действия, например измерением агрегации клеток, экспрессирующих ТРО-рецептор.

Изобретение относится к молекулам ДНК, кодирующим модифицированные антитела.

Изобретение относится к клеткам животных или микроорганизмов, которые продуцируют модифицированные антитела.

Изобретение относится к использованию модифицированного антитела в качестве ТРО-агониста.

Изобретение относится к способу трансдукции сигнала в клетки путем поперечного сшивания ТРО-рецептора с помощью модифицированного антитела и индуцирования таким образом ТРО-агонистического действия, как, например, пролиферации, дифференцировки-индукции, или стимуляции роста мегакариоцитов, образования тромбоцитов, фосфорилирования белка ТРО-рецептора и т.д.

Изобретение относится к лекарственному средству для лечения тромбоцитопении и т.п., которое содержит модифицированное антитело в качестве активного компонента.

Изобретение относится к применению модифицированного антитела в качестве лекарственного средства.

Изобретение относится к способу скрининга или количественного определения модифицированного антитела, которое содержит две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела и оказывает ТРО-агонистическое действие путем поперечного сшивания ТРО-рецептора, причем способ включает 1) получение модифицированного антитела, содержащего две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела и специфически связывающегося с ТРО-рецептором, 2) контактирование модифицированного антитела с клетками, экспрессирующими ТРО-рецептор и 3) измерение ТРО-агонистического действия, которое происходит в клетках путем образования поперечных сшивок ТРО-рецептора. Способ количественного

определения применяется для контроля качества при производстве модифицированных антител по изобретению в качестве лекарственных средств и в других целях.

Модифицированные антитела могут быть как моноспецифичными модифицированными антителами, так и мультиспецифичными модифицированными антителами, например биспецифичными модифицированными антителами. Предпочтительными являются моноспецифичные модифицированные антитела.

Настоящее изобретение относится также к модифицированным антителам, у которых V-область H-цепи и/или V-область L-цепи - это V-область H-цепи, происходящая из человеческого антитела, и/или V-область L-цепи, происходящая из человеческого антитела. V-область H-цепи и/или V-область L-цепи, происходящие из человеческого антитела, можно получить путем скрининга библиотеки моноклонального антитела, как это описано в WO 99/10494. V-область H-цепи и/или V-область L-цепи, происходящие из человеческих моноклональных антител, продуцируемых трансгенными мышами и т.п., также включены в изобретение.

Кроме того, изобретение относится также к модифицированным антителам, у которых V-области H-цепи и/или V-области L-цепи являются гуманизированными V-областями H-цепи и/или гуманизованными V-областями L-цепи. Конкретно, гуманизированные модифицированные антитела состоят из гуманизированной V-области L-цепи, которая содержит каркасные области (FR), происходящие из V-области L-цепи человеческого моноклонального антитела, и области, определяющие комплементарность (далее по тексту "CDR"), происходящие из V-области L-цепи моноклонального антитела какого-либо млекопитающего, кроме человека (например, мышь, крыса, корова, овца, человекообразная обезьяна), и/или гуманизированной V-области H-цепи, содержащей FR, происходящие из V-области H-цепи человеческого моноклонального антитела, и CDR, происходящие из V-области H-цепи моноклонального антитела какого-либо млекопитающего, кроме человека (например, мышь, крыса, корова, овца, человекообразная обезьяна). В этом случае аминокислотные последовательности CDR и FR могут быть частично изменены, например делетированы, замещены или добавлены.

V-области H-цепи и/или V-области L-цепи модифицированных антител по изобретению могут быть V-областями H-цепи и/или V-областями L-цепи, происходящими из моноклональных антител млекопитающих, кроме человека (например, мышь, крыса, корова, овца, человекообразная обезьяна, цыпленок и т.п.). В этом случае аминокислотные последовательности CDR и FR могут быть частично изменены, например делетированы, замещены или добавлены.

Изобретение относится также к молекулам ДНК, кодирующим различные модифицированные антитела, как это было указано выше, и к генно-инженерным методам получения рекомбинантных векторов, включающих ДНК.

Изобретение относится также к клеткам-хозяевам, трансформированным рекомбинантными векторами. Примерами клеток-хозяев могут быть человеческие клетки, мышинные и т.п. и микроорганизмы, как *E. coli*, *Bacillus subtilis*, дрожжи и т.д.

Изобретение относится также к способу получения модифицированных антител, который включает культивирование вышеупомянутых клеток-хозяев и экстрагирование модифицированных антител из полученной культуры.

Кроме того, изобретение относится также к способу получения димера одноцепочечного Fv, который включает культивирование животных клеток-хозяев, продуцирующих одноцепочечный Fv, в бессывороточной среде для секреции одноцепочечного Fv в среду и выделение димера одноцепочечного Fv, образующегося в среде.

Изобретение относится также к применению модифицированных антител в качестве ТРО-агониста. Это значит, что оно относится к агонисту трансдукции сигнала, который включает в себя в качестве активной составляющей модифицированное антитело, полученное вышеуказанным способом.

Таким образом, фармацевтические препараты, содержащие ТРО-агонистические модифицированные антитела по изобретению в качестве активного компонента, могут быть



использованы в качестве профилактических или лечебных средств при заболеваниях крови, связанных с уменьшением содержания тромбоцитов, тромбоцитопении, вызванной химиотерапией при раковых заболеваниях или лейкемии, и т.п.

5 Модифицированные антитела настоящего изобретения содержат две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи, происходящие из антител. По своей структуре модифицированное антитело может быть димером одноцепочечного Fv, содержащего одну V-область H-цепи и одну V-область L-цепи, или полипептидом, содержащим две V-области H-цепи и две V-области L-цепи. У модифицированных антител по изобретению V-области H-цепи и L-цепи связаны предпочтительно через пептидный  
10 линкер, который состоит из одной или более аминокислот. Получающиеся модифицированные антитела содержат переменные области антител и связываются с антигеном с такой же специфичностью, что и исходные моноклональные антитела.

#### V-область H-цепи

Согласно настоящему изобретению, V-область H-цепи, происходящая из антитела,  
15 распознает TPO-рецептор и олигомеризует, например димеризует, вышеназванную молекулу путем образования поперечной сшивки, трансдуцируя таким образом сигнал в клетки. V-область H-цепи по настоящему изобретению включает V-области H-цепи, происходящие из какого-либо млекопитающего (например, человеческие, мышинные, крысиные, бычьи, овечьи, человекообразных обезьян и т.п.), и V-области H-цепи,  
20 содержащие частично модифицированные аминокислотные последовательности V-областей H-цепей. Более предпочтительной является гуманизованная V-область H-цепи, содержащая FR V-области H-цепи человеческого моноклонального антитела и CDR-участок V-области H-цепи мышинного моноклонального антитела. Также предпочтительной является V-область H-цепи, имеющая аминокислотную последовательность, происходящую из  
25 человека, которую можно получить рекомбинантным методом. V-область H-цепи по изобретению может быть фрагментом вышеуказанной V-области H-цепи, каковой фрагмент сохраняет способность связывать антиген.

#### V-область L-цепи

Согласно настоящему изобретению, V-область L-цепи, происходящая из антитела,  
30 распознает TPO-рецептор и олигомеризует, например димеризует, вышеназванную молекулу путем образования поперечной сшивки, трансдуцируя таким образом сигнал в клетки. V-область L-цепи по настоящему изобретению включает V-области L-цепи, происходящие из млекопитающего (например, человеческие, мышинные, крысиные, бычьи, овечьи, человекообразных обезьян и т.п.), и V-области L-цепи, содержащие частично  
35 модифицированные аминокислотные последовательности V-областей L-цепи. Более предпочтительной является гуманизованная V-область L-цепи, содержащая FR V-области L-цепи человеческого моноклонального антитела и CDR V-области L-цепи мышинного моноклонального антитела. Также предпочтительной является V-область L-цепи, имеющая аминокислотную последовательность, происходящую из человека, которую  
40 можно получить рекомбинантным методом. V-область L-цепи по изобретению может быть фрагментом вышеуказанной V-области L-цепи, каковой фрагмент сохраняет способность связывать антиген.

#### Область, определяющая комплементарность (CDR)

Каждая V-область L-цепи и H-цепи образует антигенсвязывающий сайт. Переменная  
45 область L- и H-цепей составлена из четырех сравнительно консервативных общих каркасных областей, соединенных с тремя гиперпеременными участками, или областями, определяющими комплементарность (CDR) (Kabat E.A. et al., "Sequences of Protein of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983).

Главные части четырех каркасных областей (FRs) образуют  $\beta$ -складчатые структуры, а  
50 три CDR образуют, таким образом, петлю. В некоторых случаях CDR могут образовывать часть  $\beta$ -складчатой структуры. Три CDR удерживаются в пространственно близком положении друг к другу с помощью FR, который вносит вклад в формирование антигенсвязывающего сайта наряду с тремя CDR.

Эти CDR можно идентифицировать, сравнивая аминокислотную последовательность V-области полученного антитела с установленными аминокислотными последовательностями V-областей известных антител согласно эмпирическому правилу Kabat E.A. et al., "Sequences of Protein of Immunological Interest".

5 Одноцепочечный Fv.

Одноцепочечный Fv - это полипептидный мономер, содержащий связанные друг с другом V-область H-цепи и V-область L-цепи, происходящие из антител. Полученные одноцепочечные Fv включают переменные области исходных антител и сохраняют области, определяющие комплементарность, и, следовательно, одноцепочечные Fv  
10 связываются с антигеном с той же специфичностью, что и исходные антитела (JP-Appl. 11-63557). Часть переменной области и/или CDR одноцепочечного Fv по изобретению или часть ее аминокислотной последовательности можно частично изменить, например, делетировать, заместить или присоединить. Вышеуказанные V-область H-цепи и V-область L-цепи, входящие в состав одноцепочечного Fv изобретения, можно соединять  
15 непосредственно или через линкер, предпочтительно через пептидный линкер. У одноцепочечного Fv может быть следующее строение: [V-область H-цепи] - [V-область L-цепи] или [V-область L-цепи] - [V-область H-цепи]. Согласно настоящему изобретению можно сделать так, чтобы одноцепочечный Fv образовывал димер, тример или тетрамер, из которых может быть образовано модифицированное антитело изобретения.

20 Одноцепочечное модифицированное антитело

Одноцепочечные модифицированные антитела настоящего изобретения, содержащие две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи, предпочтительно от двух до четырех каждой, особенно предпочтительно по две каждой, содержат две или более V-области H-цепи и V-области L-цепи, как указано выше. Каждая из областей  
25 пептида должна быть организована так, чтобы модифицированное одноцепочное антитело образовывало специфическую пространственную структуру, точно имитирующую пространственную структуру, образуемую димером одноцепочечного Fv. Например, V-области можно расположить в нижеследующем порядке:

[V-область H-цепи] - [V-область L-цепи] - [V-область H-цепи] - [V-область L-цепи]  
30 или [V-область L-цепи] - [V-область H-цепи] - [V-область L-цепи] - [V-область H-цепи]  
, где данные области соединяются соответственно через пептидный линкер.

Линкер

Согласно изобретению, линкером для соединения V-области H-цепи с V-областью L-цепи может быть любой пептидный линкер, который может быть введен с помощью  
35 методов генной инженерии, или любой химически синтезируемый линкер. Например, согласно изобретению, можно использовать линкеры, раскрытые в литературе, например, Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996. Линкеры в одной и той же молекуле могут быть одинаковыми или разными. Если требуются пептидные линкеры, то ниже приводятся их примеры:

40 Ser  
Gly-Ser  
Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Ser  
45 Ser-Gly-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly  
50 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly  
(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> и  
(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>n</sub>,

где  $n$  - целое число не менее единицы. Предпочтительная длина пептида-линкера варьирует в зависимости от того, какой рецептор будет антигеном, для одноцепочечных Fv обычно предпочтительным является диапазон 1-20 аминокислот. В случае одноцепочечных модифицированных антител, содержащих две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи, пептидные линкеры, соединяющие области, образующие один и тот же антигенсвязывающий центр, включающий [V-область H-цепи] - [V-область L-цепи] (или [V-область L-цепи] - [V-область H-цепи]), имеют длину от 1-30 аминокислот, предпочтительно 1-20 аминокислот, более предпочтительно 3-18 аминокислот. Пептидные линкеры, соединяющие области, не образующие общий антигенсвязывающий центр, включающий [V-область H-цепи] - [V-область L-цепи] (или [V-область L-цепи] - [V-область H-цепи]), имеют длину от 1-40 аминокислот, предпочтительно 3-30 аминокислот, более предпочтительно 5-20 аминокислот. Способ введения этих линкеров будет описан ниже при объяснении конструирования ДНК, кодирующей модифицированные антитела изобретения.

Химически синтезированными линкерами, то есть химическими поперечносшивающими агентами, согласно изобретению, могут быть любые линкеры, применяемые обычно для сшивания пептидов. В число таких линкеров входят N-гидроксисукцинимид (NHS), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS<sup>3</sup>), дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), этиленгликольбис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), этиленгликольбис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), бис[2-(сукцинимидооксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES), бис[2-(сульфосукцинимидооксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES) и т.п. Все они являются коммерчески доступными. Предпочтительно, чтобы химически синтезированные линкеры имели длину, равную длине пептидных линкеров.

Для получения димера одноцепочечного Fv предпочтительно выбирать линкер, подходящий для димеризации в таком растворе, как культурная среда, более 20% одноцепочечных Fv, продуцируемых в клетках-хозяевах, предпочтительно более 50%, более предпочтительно более 80%, наиболее предпочтительно более 90%. Особенно предпочтительным является линкер, включающий от 2 до 12 аминокислот, предпочтительно от 3 до 10 аминокислот, или же другие линкеры, соответствующие им.

#### Получение модифицированных антител

Модифицированные антитела можно получать присоединением, через вышеуказанный линкер, V-области H-цепи и V-области L-цепи, происходящих из известных или новых антител, специфически связывающихся с TPO-рецептором. В качестве примеров одноцепочечных Fv приводятся те, что содержат V-область H-цепи и V-область L-цепи антитела 12B5 и антитела 12E10, раскрытых в WO 99/10494. В качестве примеров модифицированных антител по изобретению, содержащих две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи, приводятся димер sc12B5 (линкер: 15 аминокислот), димер sc12E10 (линкер: 15 аминокислот), димер db12B5 (линкер: 5 аминокислот), димер db12E10 (линкер: 5 аминокислот), sc12B5sc(FV)<sub>2</sub> и sc12E10sc(FV)<sub>2</sub>, которые содержат V-области H-цепи и V-области L-цепи, происходящие из вышеуказанных моноклональных антител.

При получении модифицированных антител сигнальный пептид можно присоединять к его N-концу, если нужно, чтобы полученный полипептид был секреторным пептидом. Для эффективной очистки полипептида можно применить такую широко используемую для очистки полипептидов аминокислотную последовательность, как FLAG-последовательность. В этом случае димер можно получить с использованием анти-FLAG антитела.

Для получения модифицированного антитела по изобретению необходимо получить ДНК, то есть ДНК, кодирующую одноцепочечный Fv, или ДНК, кодирующую реконструированный одноцепочечный полипептид. Эти ДНК могут быть получены,

особенно для sc12B5, db12B5, sc12E10 и/или db12E10, из ДНК, кодирующих V-области H-цепи и V-области L-цепи, происходящие из указанных Fv. Их можно также получить методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя эти ДНК в качестве матрицы и амплифицируя фрагменты ДНК, содержащиеся в них, которые кодируют требуемую аминокислотную последовательность, с помощью двух праймеров, соответствующих обоим концам последовательности.

Если нужно, чтобы каждая V-область содержала частично модифицированную аминокислотную последовательность, то такие V-области, в которых модифицированы, то есть утрачены, замещены или добавлены одна или несколько аминокислот, можно получить с помощью хорошо известного из уровня техники метода ПЦР. Для того чтобы получить модифицированное антитело, которое было бы достаточно активным в отношении специфического антигена, предпочтительно модифицировать часть аминокислотной последовательности V-области методом ПЦР, хорошо известным из уровня техники.

Для выбора праймеров для амплификации методом ПЦР, если в качестве исходного материала используется моноклональное антитело, определяют типы H-и L-цепей методом типирования, известным из уровня техники.

Для амплификации V-областей L-цепи антитела 12B5 и антитела 12E10 методом ПЦР 5'-концевой и 3'-концевой олигонуклеотидные праймеры выбирают, как упомянуто выше. Таким же образом выбирают 5'-концевой и 3'-концевой олигонуклеотидные праймеры для амплификации V-областей H-цепи антитела 12B5 и антитела 12E10.

В воплощениях изобретения используются 5'-концевые праймеры, которые содержат последовательность "GANTC", обеспечивающую сайт узнавания рестриктазы Hinf I, вблизи от их 5'-конца, и 3'-концевые, которые содержат нуклеотидную последовательность "CCCGGG", обеспечивающую сайт узнавания XmaI, вблизи от их 5'-конца. Вместо этих сайтов можно использовать сайты узнавания других рестриктаз до тех пор, пока их применяют для субклонирования требуемых фрагментов ДНК в клонирующий вектор.

Специально сконструированные ПЦР-праймеры применяют для того, чтобы обеспечить соответствующие нуклеотидные последовательности на 5'-конце и 3'-конце кДНК, кодирующей V-области антител 12B5 и 12E10, так, чтобы кДНК легко встраивалась в экспрессионный вектор и функционировала бы в экспрессионном векторе соответствующим образом (т.е. изобретение предусматривает увеличение эффективности транскрипции за счет встраивания последовательности Козака). V-области антител 12B5 и 12E10, полученные амплификацией методом ПЦР с использованием таких праймеров, встраивают в экспрессионный вектор HEF, содержащий желаемую C-область человека (см. WO 92/19759). Клонированные ДНК можно секвенировать любым общепринятым способом, например, с помощью автоматического секвенатора ДНК (Applied Biosystems).

Линкер, такой как, например, пептидный линкер, можно ввести в модифицированное антитело изобретения следующим образом. Конструируют праймеры, которые имеют последовательности, частично комплементарные праймерам для V-областей H-цепей и V-областей L-цепей, описанным выше, и которые кодируют N-конец и C-конец линкера. Затем можно провести ПЦР с использованием этих праймеров для получения ДНК, кодирующей пептидный линкер, имеющий желаемые аминокислотную последовательность и длину. ДНК, кодирующие V-область H-цепи и V-область L-цепи, можно состыковать с помощью полученной ДНК, чтобы получить ДНК, кодирующую модифицированное антитело изобретения, содержащее требуемый пептидный линкер. Как только получена ДНК, кодирующая одно из модифицированных антител, легко можно получить ДНК, кодирующие модифицированные антитела с требуемым пептидным линкером или без него, путем конструирования различных праймеров для линкера, а затем проведения ПЦР с использованием праймеров и вышеуказанной ДНК в качестве матрицы.

Каждую V-область модифицированного антитела настоящего изобретения можно гуманизировать по общепринятой методике (Sato K. et al., Cancer Res., 53, 1-6 (1993)). Как только получена ДНК, кодирующая каждый из гуманизированных Fv, легко

можно получить гуманизированный одноцепочечный Fv, фрагмент гуманизованного одноцепочечного Fv, гуманизованное моноклональное антитело и фрагмент гуманизованного моноклонального антитела в соответствии с общепринятой методикой. Предпочтительно, чтобы аминокислотные последовательности их V-областей могли быть при необходимости частично модифицированы.

Далее, можно получить ДНК, происходящую от другого млекопитающего, например, ДНК, кодирующую каждую из V-областей антитела человека, таким же способом, каким была получена ДНК, кодирующая V-область H-цепи и V-область L-цепи, происходящие из мыши, в соответствии с общепринятыми методами, упомянутыми выше. Результирующую ДНК можно использовать для получения V-области H-цепи и V-области L-цепи других млекопитающих, в частности, происходящих из антитела человека, одноцепочечный Fv, происходящий из человека, и его фрагмент, и моноклональное антитело человеческого происхождения и его фрагмент.

В случаях, когда модифицированные антитела, соответствующие изобретению, являются биспецифическими модифицированными антителами, их получают одним из известных из уровня техники способов (например, способ, описанный в WO 9413804).

Как было указано выше, когда получены требуемые ДНК, кодирующие V-области модифицированных антител и V-области гуманизованных модифицированных антител, то можно получить содержащие их экспрессионные векторы и хозяев,

трансформированных этими векторами, стандартными способами. Кроме того, стандартными методами можно культивировать хозяев, для того чтобы получить реконструированный одноцепочечный Fv, реконструированный гуманизированный одноцепочечный Fv, гуманизованные моноклональные антитела и их фрагменты. Их можно выделить из клеток или из среды и очистить до гомогенной массы. В этих целях можно применять любые стандартные методы выделения и очистки, применяемые для белков, например хроматографию, ультрафильтрацию, высаливание и диализ, при необходимости комбинируя их без каких-либо ограничений.

Если реконструированный одноцепочечный Fv настоящего изобретения получают культивированием животной клетки, такой как, например, COS7-клетки или CHO-клетки, предпочтительно CHO-клетки, в бессывороточной среде, то можно стабильно получать и очищать с высоким выходом образующийся в данной среде димер Fv. Такой очищенный димер может стабильно храниться в течение длительного срока. В качестве бессывороточной среды, применяемой согласно изобретению, можно использовать любую среду, стандартно применяемую при получении рекомбинантных белков, без каких-либо ограничений.

Для получения модифицированных антител настоящего изобретения можно использовать любые системы экспрессии, например, такие эукариотические клетки, как животные клетки, например, адаптированные линии клеток млекопитающих, нитчатые грибы и дрожжи, и такие прокариотические клетки, как клетки бактерий, например, E.coli. Модифицированные антитела по изобретению предпочтительно экспрессировать в клетках млекопитающих, например, COS7-клетках или CHO-клетках.

В таких случаях можно использовать стандартные промоторы, пригодные для экспрессии в клетках млекопитающих. Предпочтительно использовать немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (HCMV). В число экспрессионных векторов, содержащих HCMV-промотор, входят HCMV-VH-HC $\gamma$  1, HCMV-VL-HC и т.п., которые получены из pSV2neo (WO 92/19759).

Примеры других промоторов для экспрессии генов в клетках млекопитающих, которые можно использовать согласно изобретению, дополнительно включают вирусные промоторы, происходящие из ретровируса, вируса полиомы, аденовируса и обезьяньего вируса 40 (SV40), и такие промоторы, происходящие из млекопитающих, как, например, фактор-1 $\alpha$  элонгации полипептидной цепи человека (HEF-1 $\alpha$ ). Промотор SV40 легко может быть использован по способу Mulligan R.C. et al. (Nature 277, 108-114 (1979)), а промотор HEF-1 $\alpha$  - по способу Mizushima S. et al. (Nucleic Acids Research, 18, 5322 (1990)).

Примеры ориджина - точки инициации репликации (ori), которые могут, согласно изобретению, быть использованы, включают ori, происходящие из SV40, вируса полиомы, аденовируса, вируса бычьей папилломы (BPV) и т.п. Экспрессионный вектор может включать в качестве селективного маркера ген фосфотрансферазы APH (3') II или I (neo), ген тимидинкиназы (TK), ген ксантин-гуанинфосфорибосилтрансферазы E.coli (Ecoopt) или ген дигидрофолатредуктазы (DHFR).

Антигенсвязывающую активность полученного выше модифицированного антитела можно количественно определить стандартными методами, такими как, например, радиоиммуноанализ (РИА), ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) или поверхностный плазменный резонанс. Ее можно также оценить, используя в качестве показателя способность ингибировать связывание исходного антитела, например, по отсутствию или наличию зависящего от концентрации ингибирования связывания указанного моноклонального антитела с антигеном.

Если более подробно, то культивируют клетки животного происхождения, трансформированные экспрессионным вектором, содержащим ДНК, кодирующую модифицированное антитело, соответствующее изобретению, например культивируют клетки COS7 или клетки CHO. Культивируемые клетки и/или супернатант среды или очищенное модифицированное антитело используют для определения связывания с антигеном. Для контроля используют супернатант культуральной среды, в которой культивировались клетки, трансформированные одним только экспрессионным вектором. В случае антигена, например, для антитела 12B5 и антитела 12E10 к клеткам Ba/F3, экспрессирующим MPL человека, добавляют исследуемый образец модифицированного антитела по изобретению или супернатант контрольной пробы, а затем проводят анализ, например, методом проточной цитометрии для количественного определения антигенсвязывающей активности.

В условиях *in vitro* количественную оценку эффекта трансдукции сигнала (например, пролиферации, дифференцировки-индукции или стимуляции роста мегакариоцитов, образования тромбоцитов или фосфорилирования белка TPO-рецептора) выполняют следующим образом. Исследуемый образец вышеуказанного модифицированного антитела добавляют к клеткам, экспрессирующим антитело, или к клеткам, в которые введен ген данного антитела, и по изменениям, вызванным трансдукцией сигнала (например, по пролиферации, специфичной в отношении MPL-антигена человека, по измерению фосфорилирования белков или экспрессии тромбоцитоспецифического антигена), дают количественную оценку стандартными методами.

В условиях *in vivo* количественное определение проводят путем введения мышам моноклонального антитела, распознающего MPL, модифицированного антитела по изобретению и забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) в качестве контроля и путем количественного определения степени активности по изменению количества тромбоцитов в мышинной сыворотке.

Как указано выше, модифицированные антитела изобретения могут быть получены конструированием модифицированных антител, которые содержат две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи и специфически связываются с TPO-рецептором, и проводя скрининг модифицированных антител с использованием способов анализа *in vivo* или *in vitro*, как это описано выше.

Модифицированные антитела по изобретению, которые содержат две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи, предпочтительно от 2 до 4 каждой, более предпочтительно по 2 каждой, могут быть димерами одноцепочного Fv, содержащего одну V-область H-цепи и одну V-область L-цепи, или одноцепочными полипептидами, в молекуле которых соединены две или более V-области H-цепи и V-области L-цепи. Полагают, что благодаря такому строению, пептид имитирует трехмерную структуру TPO, а следовательно, сохраняет превосходную антигенсвязывающую способность и TPO-агонистическую активность.

Модифицированные антитела изобретения имеют значительно меньшие молекулярные

размеры по сравнению с молекулой исходного антитела (например, IgG) и поэтому отличаются высокой проникающей способностью в ткани и опухоли и более высокой активностью, чем молекулы исходного моноклонального антитела. Следовательно, модифицированные антитела изобретения способны эффективно трансдуцировать ТРО-сигнал в клетки. Фармацевтические композиции, их содержащие, могут применяться для лечения заболеваний крови, связанных со снижением количества тромбоцитов, и тромбоцитопении, вызываемой химиотерапией при раковых заболеваниях и лейкемии. Помимо этого, антитело по изобретению можно будет использовать как контрастный агент при радиоиммунном мечении. Эффект можно усилить путем присоединения к радиоиммунному соединению или токсину.

Перечень чертежей

Фиг.1 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что антитело IgG человека не связывается клетками L1210, экспрессирующими IAP человека (hIAP/L1210).

Фиг.2 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что химерное антитело MABL-1 специфически связывается с клетками L1210, экспрессирующими IAP человека (hIAP/L1210).

Фиг.3 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что химерное антитело MABL-2 специфически связывается с клетками L1210, экспрессирующими IAP человека (hIAP/L1210).

Фиг.4 схематически иллюстрирует способ получения одноцепочечного Fv в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг.5 отображает структуру экспрессионной плазмиды, которую можно использовать для экспрессии ДНК, кодирующей одноцепочечный Fv изобретения, в E coli.

Фиг.6 отображает структуру экспрессионной плазмиды, которая используется для экспрессии ДНК, кодирующей одноцепочечный Fv изобретения, в клетках млекопитающих.

Фиг.7 иллюстрирует результаты Western блоттинга из Примера 5.4. Слева: маркер молекулярных масс (сверху вниз 97,4, 66, 45, 31, 21,5 и 14,5 кДа), культуральный супернатант клеток COS7, содержащих pCHO1, и культуральный супернатант клеток COS7, содержащих pCHOM2. Здесь показано, что реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 (стрелка) содержится в супернатанте клеток, содержащих pCHOM2.

Фиг.8 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что контрольное антитело из культурального супернатанта клеток pCHO1/COS7 не связывается с контрольными клетками pCOS1/L1210.

Фиг.9 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что антитело из культурального супернатанта клеток MABL2-scFv/COS7 не связывается с контрольными клетками pCOS1/L1210.

Фиг.10 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что антитело из культурального супернатанта клеток pCOS1/COS7 в качестве контроля не связывается с клетками hIAP/L1210.

Фиг.11 иллюстрирует результаты проточной цитометрии, показывающие, что антитело из культурального супернатанта клеток MABL2-scFv/COS7 специфически связывается с клетками hIAP/L1210.

Фиг.12 иллюстрирует результаты конкурентного иммуноанализа ELISA из Примера 5.6, где связывающая активность одноцепочечного Fv изобретения (MABL2-scFv) в отношении антигена, сравнительно с культуральным супернатантом контрольных клеток pCHO1/COS7, выражена в форме ингибирования связывания антигена моноклональным антителом MABL-2 мыши, принятого за показатель.

Фиг.13 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего эффекта из Примера 5.7, показывающие, что контрольное антитело из культурального супернатанта клеток pCHO1/COS7 не индуцирует апоптоз контрольных клеток pCOS1/L1210.

Фиг.14 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего эффекта из Примера 5.7, показывающие, что антитело из культурального супернатанта клеток MABL2-scFv/COS7 не

индуцирует апоптоз контрольных клеток рCOS1/L1210.

Фиг.15 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего эффекта из Примера 5.7, показывающие, что контрольное антитело из культурального супернатанта клеток рCHO1/COS7 не индуцирует апоптоз клеток hIAP/L1210.

5 Фиг.16 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего эффекта из Примера 5.7, показывающие, что контрольное антитело из культурального супернатанта клеток MABL2-scFv/COS7 специфически индуцирует апоптоз клеток hIAP/L1210.

10 Фиг.17 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего эффекта из Примера 5.7, показывающие, что контрольное антитело из культурального супернатанта клеток рCHO1/COS7 не индуцирует апоптоз клеток CCRF-CEM (при 50%-ной конечной концентрации).

15 Фиг.18 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего эффекта из Примера 5.7, показывающие, что антитело из культурального супернатанта клеток MABL2-scFv/COS7 специфически индуцирует апоптоз клеток CCRF-CEM (при 50%-ной конечной концентрации).

Фиг.19 изображает хроматограмму, полученную при очистке одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2, продуцируемого клетками CHO из Примера 5.9, которая показывает, что фракция А и фракция В получают в виде основных пиков при очистке фракции с колонки с Blue-Sepharose на колонке с гидроксипатитом.

20 Фиг.20 иллюстрирует результаты очистки гель-фильтрацией фракции А и фракции В, полученных в Примере 5.9-(2), показывающие, что основные пики (AI и BI соответственно) элюируются в случае фракции А с кажущимся молекулярным весом около 36 кДа и в случае фракции В - около 76 кДа.

25 Фиг.21 иллюстрирует SDS-PAGE-анализ фракций, полученных при очистке одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2, продуцируемого клетками CHO в Примере 5.9, показывающий, что в обеих фракциях наблюдается единственная полоса с молекулярным весом около 35 кДа.

30 Фиг.22 отражает результаты анализа фракций AI и BI, полученных гель-фильтрацией при очистке одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2, продуцируемого клетками CHO, где фракция AI включает мономер, а фракция BI включает димер.

Фиг.23 иллюстрирует структуру экспрессионной плазмиды, которую можно использовать для экспрессии ДНК, кодирующей одноцепочечный Fv изобретения, в E.coli.

35 Фиг.24 иллюстрирует результаты очистки на гель-фильтрационной колонке грубого препарата одноцепочечного Fv полипептида, происходящего из антитела MABL-2, продуцируемого E.coli. полученных в Примере 5.12, где пики соответствуют мономеру или димеру одноцепочечного Fv, продуцируемого E.coli.

Фиг.25 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5.13, показывающие, что контрольное антитело IgG мыши не индуцирует апоптоз клеток hIAP/L1210 (конечная концентрация 3 мкг/мл).

40 Фиг.26 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5.13, показывающие, что димер MABL2-scFv, продуцируемый клетками CHO, в значительной степени индуцирует апоптоз клеток hIAP/L1210 (конечная концентрация 3 мкг/мл).

45 Фиг.27 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5.13, показывающие, что димер MABL2-scFv, продуцируемый E.coli., в значительной степени индуцирует апоптоз клеток hIAP/L1210 (конечная концентрация 3 мкг/мл).

Фиг.28 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5.13, показывающие, что индукция апоптоза клеток hIAP/L1210 мономером MABL2-scFv, продуцируемым клетками CHO, по величине такая же, что и в контроле (конечная концентрация 3 мкг/мл).

50 Фиг.29 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5.13, показывающие, что индукция апоптоза клеток hIAP/L1210 мономером MABL2-scFv, продуцируемым E.coli., по величине такая же, что и в контроле (конечная концентрация 3 мкг/мл).



Фиг.30 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5. 13, показывающие, что контрольное антитело IgG мыши не индуцирует апоптоз у клеток hIAP/L1210 даже при добавлении анти-FLAG антитела (конечная концентрация 3 мкг/мл).

5 Фиг.31 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 5.13, показывающие, что мономер MABL2-scFv, продуцируемый клетками CHO, в значительной степени индуцирует апоптоз клеток hIAP/L1210 при условии добавления анти-FLAG антитела (конечная концентрация 3 мкг/мл).

10 Фиг.32 иллюстрирует результаты количественного определения IgG человека в сыворотке мыши с трансплантированной клеточной линией миеломы человека KPM2, показывающие количество IgG человека, продуцируемого клетками миеломы человека в мыши. Видно, что димер scFv/CHO в значительной степени тормозит рост клеток KPM2.

Фиг.33 иллюстрирует продолжительность выживания мыши после трансплантации опухоли, показывая, что у группы, которой был введен димер scFv/CHO, продолжительность выживания значительно увеличивается.

15 Фиг.34 иллюстрирует структуру экспрессионной плазмиды, которая экспрессирует модифицированное антитело [sc(Fv)<sub>2</sub>], содержащее две V-области H-цепи и две V-области L-цепи, происходящие из антитела MABL-2.

20 Фиг.35 иллюстрирует структуру плазмиды, которая экспрессирует scFv (HL-тип) в котором V-области связаны без пептидного линкера следующим образом: [H-цепь] - [L-цепь].

Фиг.36 иллюстрирует структуру полипептида HL-типа и аминокислотные последовательности пептидных линкеров.

25 Фиг.37 иллюстрирует структуру плазмиды, которая экспрессирует scFv (LH-тип), в котором V-области соединены без пептидного линкера следующим образом: [L-цепь] - [H-цепь].

Фиг.38 иллюстрирует структуру полипептида LH-типа и аминокислотные последовательности пептидных линкеров.

30 Фиг.39 иллюстрирует результаты Western блоттинга из Примера 6.4, показывающие, что экспрессируются модифицированное антитело sc(Fv)<sub>2</sub>, содержащее две V-области H-цепи и две V-области L-цепи, и MABL2-scFv, содержащие пептидные линкеры различной длины.

Фиг.40а и 40б иллюстрируют результаты проточной цитометрии с использованием культурального супернатанта клеток COS7, полученного из Примера 6.3 (1), показывающие, что MABL2-scFv и sc(Fv)<sub>2</sub>, имеющие пептидные линкеры различной длины, имеют высокое сродство к IAP человека.

35 Фиг.41а и 41б иллюстрируют результаты апоптоз-индуцирующего действия из Примера 6.6, показывающие, что scFv<HL3, 4, 6, 7, LH3, 4, 6, и 7> и sc(Fv)<sub>2</sub> в значительной степени индуцируют клеточную смерть у клеток hIAP/L1210.

40 Фиг.42 иллюстрирует результаты определения антигенсвязывающей способности из Примера 6.10, показывающие, что димер ScFv <HL5> и sc(Fv)<sub>2</sub> имеют высокое сродство к IAP человека.

Фиг.43 иллюстрирует результаты апоптоз-индуцирующего действия in vitro из Примера 6.11, показывающие, что димер ScFv <HL5> и sc(Fv)<sub>2</sub> индуцируют апоптоз клеток hIAP/L1210 и клеток CCRF-CEM зависящим от концентрации образом.

45 Фиг.44 иллюстрирует результаты количественных измерений M-белка, продуцируемого клеточной линией миеломы человека KPM2 в сыворотке мыши с трансплантированными клетками миеломы человека. Видно, что димер scFv <HL5> и sc(Fv)<sub>2</sub> в значительной степени тормозят рост клеток KPM2.

Фиг.45 иллюстрирует продолжительность выживания (в днях) мышей после трансплантации опухоли, показывая, что продолжительность выживания в группе, которой 50 был введен scFv <HL5>, в значительной степени увеличивается.

Фиг.46 иллюстрирует продолжительность выживания (в днях) мышей после трансплантации опухоли, показывая, что продолжительность выживания в группе, которой был введен sc(Fv)<sub>2</sub>, в значительной степени увеличивается.

Фиг.47 иллюстрирует схематически способ конструирования фрагмента ДНК, кодирующего реконструированный одноцепочечный Fv 12B5, содержащий линкерную последовательность, состоящую из 15 аминокислот, и его структуру.

5 Фиг.48 иллюстрирует результаты очистки гель-фильтрацией каждого из одноцепочечных Fv 12B5, полученных в Примере 7.5 (1), показывающие, что sc12B5 разделяется на два пика (фракции А и В).

Фиг.49 иллюстрирует результаты анализа каждой из фракций А и В методом SDS-PAGE, проведенного в Примере 7.5 (2).

10 Фиг.50а и 50b иллюстрирует результаты анализа каждой из фракций А и В на колонке Superdex200, проведенного в Примере 7.5 (2), показывающие, что основной пик фракции А элюируется с кажущейся молекулярной массой около 44 кДа (а) и что основной пик фракции В элюируется с кажущейся молекулярной массой около 22 кДа (b).

15 Фиг.51 иллюстрирует результаты измерения ТРО-подобной агонистической активности sc12B5 и антитела 12B5 (IgG, Fab), показывающие, что 12B5IgG и моновалентный одноцепочечный Fv (sc12B5) проявляют ТРО-подобную агонистическую активность, зависящую от концентрации.

Фиг.52 иллюстрирует результаты измерения ТРО-подобной агонистической активности мономера и димера sc12B5, показывающие, что одноцепочечный Fv (димер sc12B5), имеющий бивалентный антигенсвязывающий центр, имеет агонистическую активность в 20 400 раз выше, чем у моновалентного sc12B5, и что его эффективность равняется или превышает эффективность ТРО человека.

Фиг.53 иллюстрирует результаты очистки полученного одноцепочечного антитела sc12E10 методом гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Superdex200HR, показывающие, что db12E10 разделяется на два пика (фракции А и В).

25 Фиг.54 иллюстрирует результаты очистки полученного одноцепочечного антитела db12E10 методом гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Superdex200HR, показывающие, что db12E10 разделяется на два пика (фракции С и D).

Фиг.55 иллюстрирует анализ методом SDS-PAGE фракций А и В (sc12E10) и фракций С и D (db12E10) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

30 Фиг.56 иллюстрирует результаты анализа фракций А и В методом гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Superdex200HR, показывающие, что основной пик фракции А элюируется с кажущейся молекулярной массой около 42 кДа и что основной пик фракции В элюируется с кажущейся молекулярной массой около 20 кДа.

35 Фиг.57 иллюстрирует результаты анализа фракций С и D методом гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Superdex200HR, показывающие, что основной пик фракции С элюируется с кажущейся молекулярной массой около 69 кДа и что основной пик фракции D элюируется с кажущейся молекулярной массой около 41 кДа.

40 Фиг.58 иллюстрирует агонистическую активность различных молекул антитела 12E10 к MPL, показывающую, что одноцепочечные Fv (sc12E10, db12E10) проявляют ТРО-подобную агонистическую активность, в то время как 12E10 IgG и 12E10 Fab не проявляют.

Фиг.59 - график, иллюстрирующий агонистическую активность мономера и димера sc12E10 и димера и тримера db12E10 в отношении MPL, показывающий, что димер sc12E10 и димер и тример db12E10 проявляют более высокую ТРО-подобную агонистическую активность, чем ТРО.

45 Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Нижеследующие примеры служат лишь для иллюстрации настоящего изобретения и их ни в коем случае не следует рассматривать для ограничения объема притязаний.

Для иллюстрации способа получения модифицированных антител по изобретению ниже приводятся примеры получения одноцепочечных Fv. В приводимых примерах получения 50 таких модифицированных антител были использованы антитела мыши к IAP человека, MABL-1 MABL-2. Гибридомы MABL-1 и MABL-2, соответственно продуцирующие их, депонированы 11-го сентября 1997 г. на международном уровне в Агентстве индустриальной науки и технологии. Министерством международной торговли и

промышленности (National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Minister of International Trade and Industry (1-3 Higasi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) как уполномоченном депозитарию микроорганизмов под инвентарными номерами FERM BP-6100 и FERM BP-6101.

#### 5 Примеры

Пример 1 (клонирование молекул ДНК, кодирующих V-области моноклональных антител мыши к IAP человека)

Молекулы ДНК, кодирующие переменные области моноклональных антител мыши к IAP человека, MABL-1 и MABL-2, клонируют следующим образом.

#### 10 1.1 Получение матричной РНК(мРНК)

Получают мРНК из гибридов MABL-1 и MABL-2, используя набор для очистки мРНК (mRNA Purification Kit, Pharmacia Biotech).

#### 1.2 Синтез двухцепочечной кДНК

15 Синтезируют двухцепочечную кДНК из приблизительно 1 мкг мРНК, используя набор Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) с присоединением адаптора.

#### 1.3 ПЦР-амплификация генов, кодирующих переменные области антитела

ПЦР проводили с помощью термоциклера (Thermal Cycler, PERKLN ELMER).

#### (1) Амплификация гена, кодирующего V-область L-цепи MABL-1

20 Праймерами, используемыми в ПЦР-методе, были Adapter Primer-1 (CLONTECH), показанный в SEQ ID NO.1, который гибридизуется с частью последовательности адаптора, и праймер МКС (Mouse Kappa Constant, Bio/Technology, 9, 88-89, 1991)), показанный в SEQ ID NO.2, который гибридизуется V-областью L-цепи мыши.

В 50 мкл ПЦР-раствора содержится 5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера II, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), 2,5 единицы ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 0,2 мкМ адапторного праймера SEQ ID NO.1, 0,2 мкМ праймера-МКС SEQ ID NO.2 и 0,1 мкг двухцепочечной кДНК, происходящей из MABL-1. Раствор предварительно нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 минут, а затем в указанном порядке нагревают при 94°C в течение 1 мин, при 60°C в течение 1 мин и при 72°C - 1 мин 20 сек. Такой температурный цикл повторяют 35 раз, а затем реакционную смесь нагревают дополнительно при 72°C в течение 10 минут.

#### (2) Амплификация кДНК, кодирующей V-область H-цепи MABL-1

В качестве праймеров для ПЦР используют Adapter Primer-1, показанный в SEQ ID NO.1, и праймер МНС-γ1 (Mouse Heavy Constant (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991)), показанный в SEQ ID NO.3.

35 Амплификацию кДНК осуществляют так же, как амплификацию гена V-области L-цепи, которая описана в Примере 1.3-(1), с той разницей, что используют 0,2 мкМ праймера МНС-γ1, вместо 0,2 мкМ праймера МКС.

#### (3) Амплификация ДНК, кодирующей V-область L-цепи MABL-2

40 В качестве праймеров для ПЦР используют Adapter Primer-1, показанный в SEQ ID NO.1, и праймер МКС, показанный в SEQ ID NO.2.

Амплификацию кДНК проводят так же, как амплификацию гена V-области L-цепи MABL-1, которая описана в Примере 1.3-(1), с той разницей, что используют 0,1 мкг двухцепочечной кДНК, происходящей из MABL-2, вместо 0,1 мкг двухцепочечной кДНК, происходящей из MABL-1.

#### 45 (4) Амплификация ДНК, кодирующей V-область H-цепи MABL-2

В качестве праймеров для ПЦР используют Adapter Primer-1, показанный в SEQ ID NO.1, и праймер МНС-γ2а (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991)), показанный в SEQ ID NO.4.

50 Амплификацию кДНК проводят так же, как амплификацию гена V-области L-цепи, которая описана в Примере 1.3-(3), с той разницей, что используют 0,2 мкМ праймера МНС-γ2а вместо 0,2 мкМ праймера МКС.

#### 1.4 Очистка продуктов ПЦР

Фрагмент ДНК, амплифицированный методом ПЦР, очищают при помощи набора QIAquick ПЦР Purification Kit (QIAGEN) и растворяют в 10 mM Tris-HCl (pH 8,0),

содержащем 1 мМ ЭДТА.

#### 1.5 Лигирование и трансформация

Около 140 нг фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий V-область L-цепи каппа-типа мыши, происходящую из MABL-1, полученного так, как было описано выше, лигируют с  
5 50 нг вектора pGEM-T Easy (Promega) в реакционном буфере, содержащем 30 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотрейтола, 1 мМ АТФ и 3 единицы ДНК-лигазы T4 (Promega), при 15°C в течение 3 часов.

Затем 1 мкл реакционной смеси добавляют к 50 мкл компетентных клеток E.coli DH5α (Toyobo Inc.) и на 30 мин помещают на лед, инкубируют в термостате при 42°C в течение 1  
10 мин и вновь помещают на лед на 2 мин. Добавляют 100 мкл SOC-среды (GIBCO BRL). Клетки бактерии E.coli засевают на агаризованную среду LB (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), содержащую 100 мкг/мл ампициллина (SIGMA), и культивируют при 37°C в течение ночи для получения трансформанта E.coli.

15 Трансформант культивируют в 3 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при 37°C в течение ночи и из культуры при помощи набора QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) выделяют плазмидную ДНК.

Полученную плазмиду, содержащую ген, кодирующий V-область L-цепи каппа-типа мыши, происходящую из гибридомы MABL-1, обозначают как pGEM-M1L.

20 Точно таким же образом, как это описано выше, из очищенного фрагмента ДНК получают плазмиду, содержащую ген, кодирующий V-область H-цепи мыши, происходящую из гибридомы MABL-1, и обозначают как pGEM-M1H.

Плазмиду, содержащую ген, кодирующий V-область L-цепи каппа-типа мыши, происходящую из гибридомы MABL-2, получают из очищенного фрагмента ДНК и обозначают как pGEM-M2L.

Плазмиду, содержащую ген, кодирующий V-область H-цепи мыши, происходящую из гибридомы MABL-2, получают из очищенного фрагмента ДНК и обозначают как pGEM-M2H.

#### Пример 2 (секвенирование ДНК)

30 Определяют нуклеотидную последовательность κДНК-кодирующей области вышеуказанных плазмид при помощи секвенатора Auto DNA Sequencer (Applied Biosystem) и набора ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) в соответствии с протоколом производителя.

Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего V-область L-цепи мышинового антитела MABL-1, включенная в плазмиду pGEM-M1L, приведена в SEQ ID NO.5.

Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего V-область H-цепи антитела MABL-1 мыши, входящая в плазмиду pGEM-M1H, приведена в SEQ ID NO.6.

Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего V-область L-цепи антитела MABL-2 мыши, входящая в плазмиду pGEM-M2L, приведена в SEQ ID NO.7.

40 Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего V-область H-цепи антитела MABL-2 мыши, входящая в плазмиду pGEM-M2H, приведена в SEQ ID NO.8.

#### Пример 3 (определение CDR)

V-области L- и H-цепей бывают обычно сходными по своей структуре, и в них каждые четыре каркасные области соединены тремя гипервариабельными областями, т.е. участками, определяющим комплементарность (CDR). Аминокислотная  
45 последовательность каркаса относительно консервативна, в то время как аминокислотная последовательность CDR отличается чрезвычайно большим разнообразием (Kabat E.A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983).

50 С учетом этих фактов аминокислотные последовательности вариабельных областей мышных моноклональных антител к IAP человека были сопоставлены с базой данных по аминокислотным последовательностям антител, созданной Kabat et al., для выявления гомологии. Области CDR были определены на основе гомологии, как показано в Таблице 1.

Таблица 1

Плазмида	SEQ ID NO.	CDR (1)	CDR (2)	CDR (3)
pGEM-M1L	5	43-58	74-80	113-121
pGEM-M1H	6	50-54	69-85	118-125
pGEM-M2L	7	43-58	74-80	113-121
pGEM-M2H	8	50-54	69-85	118-125

5

Пример 4 (выявление экспрессии клонированной кДНК)

(Получение химерного антитела MABL-1 и химерного антитела MABL-2)

4.1 Получение векторов, экспрессирующих химерное антитело MABL-1

кДНК-клоны, pGEM-M1L и pGEM-M1H, кодирующие соответственно V-области L-цепи и H-цепи антитела MABL-1 мыши, модифицируют методом ПЦР и вводят в экспрессионный вектор HEF (WO 92/19759) для получения векторов, экспрессирующих химерное антитело MABL-1.

Прямой праймер MLS (SEQ ID NO.9) для V-области L-цепи и прямой праймер MHS (SEQ ID NO.10) для V-области H-цепи конструируют так, чтобы они гибридизовались с ДНК, кодирующей начало лидерной последовательности из каждой V-областей, и содержали консенсусную последовательность Козака (J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)) и сайта для рестриктазы HindIII. Обратный праймер MLAS (SEQ ID NO.11) для V-области L-цепи и обратный праймер MNAS (SEQ ID NO.12) для V-области H-цепи конструируют так, чтобы они гибридизовались с ДНК, кодирующей концевой участок J-области, и содержали донорную последовательность сплайсинга и сайт для рестриктазы BamHI.

100 мкл раствора, содержащего 10 мкл 10-кратного ПЦР-буфера II, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold, по 0,4 мкМ каждого из праймеров и 8 нг ДНК-матрицы (pGEM-M1L или pGEM-M1H), нагревают предварительно при начальной температуре 94°C в течение 9 мин, а затем проводят нагревание в следующей последовательности: при 94°C в течение 1 мин, при 60°C 1 мин и при 72°C 1 мин 20 сек. Такой температурный цикл повторяют 35 раз, а затем реакционную смесь нагревают дополнительно при 72°C в течение 10 мин.

Продукт ПЦР очищают с помощью набора QIAquick ПЦР Purification Kit (QIAGEN), а затем расщепляют ферментами HindIII и BamHI. Продукт V-области L-цепи клонируют в экспрессионном векторе HEF, HEF-κ, а продукт V-области H-цепи клонируют в экспрессионном векторе HEF, HEF-γ. После секвенирования ДНК плазмиды, содержащие ДНК-фрагменты с правильной ДНК-последовательностью, обозначают соответственно как HEF-M1L и HEF-M1H.

4.2 Получение векторов, экспрессирующих химерные антитела MABL-2

Модификацию и клонирование кДНК проводят так, как описано в Примере 4.1, с тем исключением, что используют pGEM-M2L и pGEM-M2H в качестве матричной ДНК вместо pGEM-M1L и pGEM-M1H. После секвенирования ДНК плазмиды, содержащие ДНК-фрагменты с правильной ДНК-последовательностью, обозначают соответственно как HEF-M2L и HEF-M2H.

4.3 Трансфекция в клетки COS7

Вышеупомянутые векторы экспрессии проверяют на клетках COS7 для наблюдения за временной экспрессией химерных антител MABL-1 и MABL-2.

(1) Трансфекция генами химерного антитела MABL-1

Клетки COS7 котрансформируют векторами HEF-M1L и HEF-M1H методом электропорации при помощи устройства Gene Pulser (BioRad). В кювету вносят по 10 мкг каждой ДНК и 0,8 мл PBS с  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Смесь обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ.

После 10-минутного восстановления при комнатной температуре электропорированные клетки переносят в среду для культивирования DMEM (GIBCO BRL), содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку, свободную от γ-глобулина. После 72-часового культивирования супернатант собирают, центрифугируют для удаления клеточных фрагментов и отбирают.

## (2) Трансфекция генами, кодирующими химерное антитело MABL-2

Котрансфекцию клеток COS7 генами, кодирующими химерное антитело MABL-2, выполняют так же, как в Примере 4.3-(1), с тем исключением, что используют векторы HEF-M2L и HEF-M2H вместо векторов HEF-M1L и HEF-M1H. Точно таким же образом

5 получают супернатант.

## 4.4 Проточная цитометрия

Для измерения связывания с антигеном проводят проточную цитометрию, используя вышеуказанный культуральный супернатант клеток COS7. Культуральный супернатант клеток COS7, экспрессирующих химерное антитело MABL-1, или клетки COS7,

10 экспрессирующие химерное антитело MABL-2, или антитело человека IgG (SIGMA) в качестве контроля добавляют к  $4 \times 10^5$  клеток клеточной линии лейкемии мыши L1210, экспрессирующей IAP человека, и инкубируют на льду. После отмывки туда добавляют меченное ФИТЦ антитело против IgG человека (Cappel). После инкубации и отмывания измеряют интенсивность флуоресценции при помощи аппарата FACScan (BECTON

15 DICKINSON).

Поскольку химерные антитела MABL-1 и MABL-2 специфически связываются с клетками L1210, экспрессирующими человеческий IAP, то это подтверждает, что такие химерные антитела имеют характерную структуру V-областей моноклональных антител мыши MABL-1 и MABL-2 соответственно (Фиг.1-3).

20 Пример 5 (получение реконструированного одноцепочечного Fv (scFv) антитела MABL-1 и антитела MABL-2)

## 5.1 Получение реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1

Реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-1 получают следующим образом. Методом ПЦР амплифицируют соответственно V-область H-цепи и V-область L-цепи антитела MABL-1 и линкер, и состыковывают для получения реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1. Способ получения показан на Фиг.4. Для получения одноцепочечного Fv антитела MABL-1 используют шесть праймеров (A-F). Праймеры A, C и E имеют смысловую последовательность, а праймеры D и F имеют антисмысловую последовательность.

30 Прямой праймер VHS для V-области H-цепи (Праймер A, SEQ ID NO.13) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец V-области H-цепи, содержа сайт узнавания рестриктазы NcoI. Обратный праймер VHAS для V-области H-цепи (Праймер D, SEQ ID NO.14) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей C-конец V-области H-цепи и для перекрывания линкером.

35 Прямой праймер LS для линкера (Праймер C, SEQ ID NO.15) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец линкера, и перекрывался с ДНК, кодирующей C-конец V-области H-цепи. Прямой праймер LAS для линкера (Праймер D, SEQ ID NO.16) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей C-конец линкера и перекрывался с ДНК, кодирующей N-конец V-области L-цепи.

40 Прямой праймер VLS для V-области L-цепи (Праймер E, SEQ ID NO.17) конструировали так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей C-конец линкера, и перекрывался с ДНК, кодирующей N-конец V-области L-цепи. Обратный праймер VLAS-FLAG для V-области L-цепи (Праймер F, SEQ ID NO.18) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей C-конец V-области L-цепи, и содержал последовательность, кодирующую

45 FLAG-пептид (Hopp T.P. et al., Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988), два стоп-кодона и сайт узнавания рестриктазы EcoRI.

На первом этапе ПЦР проводят три реакции, A-B, C-D и E-F, и очищают продукты ПЦР. Три ПЦР-продукта, полученных на первом этапе ПЦР, состыковывают в соответствии с их комплементарностью. Затем добавляют праймеры A и F и амплифицируют

50 полную ДНК, кодирующую реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-1 (вторая ПЦР). В первой ПЦР в качестве матрицы используют соответственно плазмиду pGEM-M1H, кодирующую V-область H-цепи антитела MABL-1 (см. Пример 2), плазмиду pSC-DPI, которая содержит ДНК-последовательность, кодирующую область

линкера, содержащую Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO.19) (Huston J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988), и плазмиду pGEM-M1L, кодирующую V-область L-цепи антитела MABL-1 (см. Пример 2).

5 50 мкл раствора для первого этапа ПЦР содержит 5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера II, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM каждого из dNTP, 2,5 единицы ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 0,4 мкМ каждого праймера и 5 нг каждой матричной ДНК. Раствор для ПЦР предварительно нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 минут, а затем последовательно нагревают при 94°C в течение 1 мин, при 65°C в течение 1 мин и при 72°C 1 мин 20 сек. Такой температурный цикл повторяют 35 раз, а затем реакцию смесь нагревают дополнительно при 72°C в течение 7 минут.

10 ПЦР-продукты A-B (371 п.о.), C-D (63 п.о.), E-F (384 п.о.) очищают с помощью набора QIAquick ПЦР Purification Kit (QIAGEN) и состыковывают в ходе второй ПЦР. Во второй ПЦР 98 мкл ПЦР-раствора, содержащего 120 нг продукта A-B первой ПЦР, 20 нг ПЦР-продукта C-D и 120 нг ПЦР-продукта E-F, 10 мкл 10-кратного ПЦР-буфера II, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM каждого из dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 15 предварительно нагревают при начальной температуре 94°C в течение 8 минут, а затем нагревают последовательно при 94°C 2 мин, при 65°C 2 мин и при 72°C 2 мин. Такой температурный цикл повторяют дважды, а затем вводят в реакцию по 0,4 мкМ 20 соответственно каждого из праймеров A и F. Смесь предварительно нагревают при начальной температуре 94°C в течение 1 мин, а затем последовательно нагревают при 94°C 1 мин, при 65°C 1 мин и при 72°C 1 мин 20 сек. Такой температурный цикл повторяют 35 раз, а затем реакцию смесь нагревают дополнительно при 72°C в течение 7 минут.

25 ДНК-фрагмент размером 843 п.о., полученный во второй ПЦР, очищают и расщепляют при помощи NcoI и EcoRI. Клонируют полученный ДНК-фрагмент в вектор pSCFVT7. Экспрессионный вектор pSCFVT7 содержит relB-сигнальную последовательность, подходящую для периплазматической системы экспрессии E.coli (Lei S.P. et al., J. Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987). После секвенирования ДНК плазмиду, содержащую фрагмент ДНК, кодирующий правильную аминокислотную последовательность 30 реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1, обозначают как "pscM1" (см. Фиг.5). Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1, содержащиеся в плазмиде pscM1, приведены в SEQ ID NO.20.

pscM1-вектор модифицируют методом ПЦР для получения вектора, экспрессирующего 35 реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-1 в клетках млекопитающих. Полученный ДНК-фрагмент встраивают в экспрессионный вектор pCHO1. Такой экспрессионный вектор, pCHO1, был сконструирован путем расщепления DHFR-ΔE-rvH-PM1-f (WO 92/19759) с использованием EcoRI и SmaI для элиминации гена антитела и присоединения к нему адаптера EcoRI-NotI-BamHI (Takara Shuzo).

40 В качестве прямого праймера для ПЦР конструируют праймер Sal-VHS, показанный в SEQ ID NO.21 так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец V-области H-цепи, и содержал сайт узнавания рестриктазы Sall. В качестве обратного праймера для ПЦР конструируют праймер FRH1-anti, показанный в SEQ ID NO.22 так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей конец первой каркасной последовательности.

45 100 мкл ПЦР-раствора, содержащего 10 мкл 10-кратного ПЦР-буфера II, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM каждого из dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold, по 0,4 мкМ каждого из праймеров и 8 нг матричной ДНК (pscM1), предварительно нагревают при начальной температуре 95°C в течение 9 мин, а затем нагревают последовательно при 95°C в течение 1 мин, при 60°C 1 мин и при 72°C 1 мин 20 сек. Такой температурный цикл 50 повторяют 35 раз, а затем реакцию смесь дополнительно нагревают при 72°C в течение 7 мин.

ПЦР-продукт очищают при помощи набора QIAquick ПЦР Purification Kit (QIAGEN), а затем расщепляют с помощью Sall и MboII для получения ДНК-фрагмента, кодирующего N-

конец реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1. Вектор pscM1 расщепляют MboII и EcoRI для получения ДНК-фрагмента, кодирующего С-конец реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1. ДНК-фрагмент Sall-MboII и ДНК-фрагмент MboII-EcoRI клонируют в вектор рСНО1-Igs. После секвенирования ДНК плазмиду, содержащую требуемую ДНК-последовательность, обозначают, как "рСНОМ1" (см. Фиг.6). Экспрессионный вектор, рСНО1-Igs, содержит сигнальную последовательность IgG1 мыши, подходящую для системы секреции-экспрессии в клетках млекопитающего (NATURE, 322, 323-327, 1988). Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-1, содержащиеся в плазмиде рСНОМ1, показаны в SEQ ID NO.23.

#### 5.2 Получение реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2

Реконструированное одноцепочечное Fv антитела MABL-2 получают согласно вышеприведенному Примеру 5.1. Для получения плазмиды pscM2, которая содержит ДНК-фрагмент, кодирующий требуемую аминокислотную последовательность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2, на первом этапе ПЦР используют плазмиду рGEM-M2H, кодирующую V-область H-цепи MABL-2 (см. Пример 2), вместо рGEM-M1H и плазмиду рGEM-M2L, кодирующую V-область L-цепи MABL-2 (см. Пример 2), вместо рGEM-M1L. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2, содержащиеся в плазмиде pscM2, приведены в SEQ ID NO.24.

Вектор pscM2 модифицируют методом ПЦР для получения вектора, рСНОМ2, для экспрессии в клетках млекопитающих, который содержит ДНК-фрагмент, кодирующий правильную аминокислотную последовательность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2, содержащиеся в плазмиде рСНОМ2, показаны в SEQ ID NO.25.

#### 5.3 Трансфекция в клетки COS7

Тестирование вектора рСНОМ2 на клетках COS7 осуществляют для того, чтобы наблюдать временную экспрессию реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2.

Клетки COS7 трансформируют вектором рСНОМ2 методом электропорации при помощи аппарата Gene Pulser (BioRad). Добавляют в кювету ДНК (10 мкг) и 0,8 мл PBS с  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Смесь обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ.

После восстановления в течение 10 мин при комнатной температуре электропорированные клетки переносят в культуральную среду IMDM (GIBCO BRL), содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку. После культивирования в течение 72 часов собирают супернатант, центрифугируют для удаления клеточных фрагментов и отбирают.

#### 5.4 Обнаружение реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2 в культуральном супернатанте клеток COS7

Присутствие реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2 в культуральном супернатанте клеток COS7, трансфицированных вектором рСНОМ2, подтверждали методом Western-блоттинга.

Культуральный супернатант клеток COS7, трансфицированных вектором рСНОМ2, и культуральный супернатант клеток COS7, трансфицированных вектором рСНОМ1, в качестве контроля подвергают электрофорезу в присутствии додецилсульфата натрия и переносят на мембрану REINFORCED NC (Schleicher & Schuell). Мембрану блокируют 5%-ным снятым молоком (Morinaga Nyu-gyo), промывают раствором 0,05% Tween 20-PBS и смешивают с антителом против FLAG (SIGMA). Мембрану инкубируют при комнатной температуре, отмывают и смешивают с антителом IgG мыши, конъюгированным с щелочной фосфатазой (Zymed). После инкубирования и отмывания при комнатной температуре добавляют раствор субстрата (Kirkegaard Perry Laboratories) для развития окраски (Фиг.7).



FLAG-пептид-специфичный белок обнаруживается только в культуральном супернатанте клеток COS7 с введенным вектором рСНОМ2, и это подтверждает, что реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 секретируется в данном культуральном супернатанте.

#### 5.5 Проточная цитометрия

Для измерения связывания с антигеном применяют метод проточной цитометрии, используя вышеуказанный культуральный супернатант клеток COS7. Культуральный супернатант клеток COS7, экспрессирующий реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2, или культуральный супернатант клеток COS7, трансформированных вектором рСНОМ1, в качестве контроля, добавляют к  $2 \times 10^5$  клеток клеточной линии лейкемии мыши L1210, экспрессирующих интегринассоциированный белок (IAP) человека, или клеточной линии L1210, трансформированной рCOS1, в качестве контроля. После инкубирования на льду и отмывания добавляют антитело против FLAG (SIGMA). Затем клетки инкубируют и отмывают. Затем туда добавляют меченное ФИТЦ антитело против IgG мыши (BECTON DICKINSON) и клетки еще раз инкубируют и отмывают. Потом измеряют интенсивность флуоресценции с помощью аппарата FACScan (BECTON DICKINSON).

Подтверждается, что поскольку одноцепочечный Fv антитела MABL-2 специфически связывается с клетками L1210, экспрессирующими IAP человека, то реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 обладает сродством к интегринассоциированному белку человека (IAP) (Фиг.8-11).

#### 5.6 Конкурентный ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA)

Связывающую активность реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2 определяли по ингибирующей активности в отношении связывания моноклональных антител мыши с антигеном.

В каждую лунку 96-луночного планшета добавляют антитело против FLAG в концентрации 1 мкг/мл и инкубируют при 37°C в течение 2 час. После отмывания проводят блокирование с использованием 1% БСА-PBS. После инкубирования и отмывания при комнатной температуре культуральный супернатант клеток COS7, в который был введен ген человеческого IAP-антигена секреторного типа (SEQ ID NO.26), разводят PBS, до двукратного объема и вносят в каждую лунку. После инкубирования и отмывания при комнатной температуре добавляют в каждую лунку смесь из 50 мкл биотинилированного антитела MABL-2 в концентрации 100 нг/мл и 50 мкл последовательно разведенного супернатанта клеток COS7, экспрессирующих реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2. После инкубирования и отмывания при комнатной температуре добавляют в каждую лунку стрептоавидин, конъюгированный со щелочной фосфатазой (Zymed). После инкубирования и отмывания при комнатной температуре добавляют раствор субстрата (SIGMA) и при 405 нм измеряют оптическую плотность реакционной смеси в каждой лунке.

Как показывают результаты, реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 (MABL2-scFv), по сравнению с взятым в качестве контроля культуральным супернатантом клеток COS7 с введенной рСНО1, несомненно ингибирует связывание антитела MABL-2 мыши с IAP-антигеном человека (Фиг.12), зависящим от концентрации образом. Следовательно, можно полагать, что реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 содержит правильную структуру каждой из V-областей моноклонального антитела MABL-2 мыши.

#### 5.7 Эффект индукции апоптоза in vitro

Апоптоз-индуцирующее действие реконструированного одноцепочечного Fv антитела MABL-2 исследуют путем окрашивания Аннексином-V (Boehringer Mannheim) с использованием клеток L1210, трансфицированных геном IAP человека, клеток L1210, трансфицированных вектором рCOS1 в качестве контроля, и клеток CCRF-CEM.

К каждому типу вышеуказанных клеток, взятых в количестве  $1 \times 10^5$  клеток, добавляют культуральный супернатант клеток COS7, экспрессирующих реконструированный

одноцепочечный Fv антитела MABL-2, или культуральный супернатант клеток COS7, трансфицированных вектором рCHO1 в качестве контроля, в конечной концентрации 50%, и смеси культивируют в течение 24 час. Затем осуществляют окрашивание Аннексином-V и измеряют интенсивность флуоресценции с помощью аппарата FACScan (BECTON DICKINSON).

Результаты окрашивания Аннексином-V показаны соответственно на Фиг.13-18. Точки в левой нижней части представляют живые клетки, точки в правой нижней части представляют клетки на ранней стадии апоптоза, точки в правой верхней части представляют клетки на поздней стадии апоптоза. Данные результаты показывают, что по сравнению с контролем реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 (MABL2-scFv) весьма заметно индуцирует клеточную смерть клеток L1210, специфичных в отношении IAP-антигена человека (Фиг.13-16), и что реконструированный одноцепочечный Fv антитела MABL-2 также весьма заметно индуцирует клеточную смерть клеток CCRF-CEM (Фиг.17-18).

#### 5.8 Экспрессия происходящего из MABL-2 одноцепочечного Fv в клетках CHO

Клетки CHO трансфицируют вектором рCPOM2 для получения линии клеток CHO, которая постоянно экспрессирует одноцепочечный Fv (полипептид), происходящий из антитела MABL-2.

Клетки CHO трансформируют вектором рCPOM2 методом электропорации при помощи прибора Gene Pulser (BioRad). В кювету вносят смесь ДНК (10 мкг) и 0,7 мл PBS с клетками CHO ( $1 \times 10^7$  клетки/мл). Смесь подвергают воздействию импульса при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ. После восстановления при комнатной температуре в течение 10 мин электропорированные клетки переносят в  $\alpha$ -MEM среду, свободную от нуклеиновой кислоты (GIBCO BRL), содержащую 10% фетальную бычью сыворотку, и культивируют. Экспрессию требуемого белка в полученных клонах подтверждают методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и отбирают клон с высоким уровнем экспрессии в качестве клеточной линии, продуцирующей одноцепочечный Fv, происходящей из MABL-2 антитела. Клеточную линию культивируют в бессывороточной среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), содержащей 10 нМ метотрексат (SIGMA). Затем культуральный супернатант собирают, центрифугируют для удаления фрагментов клеток и отбирают.

#### 5.9 Очистка происходящего из MABL-2 одноцепочечного Fv, продуцируемого в клетках CHO

Культуральный супернатант клеточной линии CHO, экспрессирующей одноцепочечный Fv, полученный в Примере 5.8, концентрируют в двадцать раз, применяя для этой цели картридж для искусственного диализа (PAN130SF, ASAHI MEDICALS). Концентрированный раствор хранят при -20°C и размораживают перед очисткой.

Очищают одноцепочечный Fv из культурального супернатанта клеток CHO при помощи трех вариантов хроматографии: на Blue-Sepharose, на гидроксипатите и гель-фильтрацией.

##### (1) Колоночная хроматография на Blue-Sepharose

Концентрированный супернатант разводят в 10 раз 20 мМ ацетатным буфером (pH 6,0) и центрифугируют для удаления нерастворимых веществ (10000 об/мин, 30 мин).

Супернатант наносят на колонку с Blue-Sepharose (20 мл), уравновешенную тем же буфером. После промывания колонки тем же буфером белки, адсорбированные на колонке, элюируют, используя ступенчатый градиент NaCl в том же буфере: 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 и вплоть до 1,0 М. Фракцию, выходящую с колонки в свободном объеме, и каждую из элюированных фракций анализируют с помощью SDS-PAGE. Фракции, наличие в которых одноцепочечного Fv подтверждается (фракции, элюированные при концентрации NaCl от 0,1 до 0,3 М), объединяют и, используя CentriPrep-10 (AMICON), концентрируют приблизительно в 20 раз.

##### (2) Гидроксипатит

Концентрированный раствор, полученный на этапе (1), разводят в 10 раз 10 мМ

фосфатным буфером (pH 7,0) и наносят на колонку с гидроксиапатитом (20 мл, BIORAD). Колонку промывают 60 мл 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,0). Затем белки, адсорбированные на колонке, элюируют линейным градиентом натрий-фосфатного буфера до концентрации 200 мМ (см. Фиг.19). Анализ фракций с помощью SDS-PAGE

5 подтверждает наличие одноцепочечного Fv во фракции А и во фракции В.

## (2) Гель-фильтрация

Каждую из фракций А и В с этапа (2) концентрируют отдельно с помощью CentriPrep-10 и наносят на колонку с TSKgel G3000SWG (21,5×600 мм), уравновешенную 20 мМ ацетатным буфером (pH 6,0), содержащим 0,15 М NaCl. Хроматограммы показаны на

10 Фиг.20. Анализ фракций с помощью SDS-PAGE подтвердил, что оба главных пика (AI и BI) соответствуют желаемому одноцепочечному Fv. При анализе путем гель-фильтрации фракция А элюируется с кажущейся молекулярной массой 36 кДа, а фракция В элюируется с массой 76 кДа. Анализ очищенных одноцепочечных Fv (AI, BI) проводят в 15% полиакриламидном геле с SDS. Пробы обрабатываются в отсутствие или в присутствии

15 восстанавливающего агента, электрофорез проводят по методу Лэммли (Laemmli). Затем окрашивают белок кумасси бриллиантовым голубым. Как показано на Фиг.21, и AI и BI дают единственную окрашенную полосу с кажущейся молекулярной массой 35 кДа, вне зависимости от отсутствия или присутствия восстанавливающего агента. На основании вышесказанного можно сделать вывод, что AI является мономером одноцепочечного Fv, а

20 BI - связанным нековалентно димером одноцепочечного Fv. Гель-фильтрационный анализ фракций AI и BI на колонке TSKgel G3000SWG (7,5×60 мм) показал, что пик мономера обнаруживается только во фракции AI, а пик димера обнаруживается только во фракции BI (Фиг.22). Фракция димера (фракция BI) соответствует 4% общего одноцепочечного Fv. Более 90% димера во фракции димера стабильно сохраняется более месяца при 4°C.

5.10 Конструирование вектора, экспрессирующего одноцепочечный Fv, происходящий из антитела MABL-2, в клетке E.coli

Для получения вектора, эффективно экспрессирующего одноцепочечный Fv, происходящий из антитела MABL-2, в клетках E.coli., вектор pscM2 модифицируют методом ПЦР. Получаемый фрагмент ДНК встраивают в экспрессионный вектор pSCFVT7.

30 В качестве прямого праймера для ПЦР праймер Nde-VHSm02, показанный в SEQ ID NO.27, конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец V-области H-цепи и содержал иницирующий кодон и сайт узнавания рестриктазы NdeI. В качестве обратного праймера для ПЦР праймер VLAS, показанный в SEQ ID NO.28, конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей C-конец V-области L-цепи, и содержал

35 два иницирующих стоп-кодона и сайт узнавания рестриктазы EcoRI. Прямой праймер, Nde-VHSm02, содержит пять точечных мутаций в той части, которая гибридизуется с ДНК, кодирующей N-конец V-области H-цепи, для эффективной экспрессии в E.coli.

100 мкл ПЦР-раствора, содержащего 10 мкл 10-кратного ПЦР-буфера №1, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждого из dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы KOD (все от TOYOBO), по 1 мкМ

40 каждого праймера и 100 нг матричной ДНК (pscM2), нагревают в следующей последовательности: при 98°C в течение 15 сек, при 65°C 2 сек и при 74°C 30 сек. Такой температурный цикл повторяют 25 раз.

ПЦР-продукт очищают с помощью набора QIAquick ПЦР Purification Kit (QIAGEN) и расщепляют ферментами NdeI и EcoRI, а затем полученный фрагмент ДНК клонируют в вектор pSCFVT7, из которого была элиминирована сигнальная последовательность ре1В при расщеплении с помощью NdeI и EcoRI. После секвенирования ДНК полученную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент с требуемой ДНК-последовательностью, обозначают как "pscM2DEm02"(см. Фиг.23). Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность одноцепочечного Fv, происходящего из MABL-2, содержащиеся в

50 плазмиде pscM2DEm02, показаны в SEQ ID NO.29.

5.11 Экспрессия одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2, в клетках E.coli

Для получения штамма E.coli, экспрессирующего одноцепочечный Fv, происходящий из

MABL-2, E.coli BL21 (DE3)pLysS (STRATAGENE) трансформируют вектором pscM2DEm02. С помощью SDS-PAGE полученные клоны анализируют на экспрессию требуемого белка, и в качестве штамма, продуцирующего одноцепочечный Fv, происходящий из MABL-2, отбирают клон с высоким уровнем экспрессии.

5 5.12 Очистка одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2, продуцируемого в E.coli

Единичную колонию E.coli., полученную путем трансформации, культивируют в 3 мл среды LB при 28°C в течение 7 час, а затем в 70 мл среды LB при 28°C в течение ночи. Такую предкультуру переносят в 7 л среды LB и культивируют в ферментере (Jar-fermenter) при 28°C при перемешивании при 300 об/мин. Когда оптическая плотность среды достигает значения O.D.=1,5, бактерии индуцируют с помощью 1 mM IPTG и затем культивируют в течение 3 час.

15 Культуральную среду центрифугируют (10000×g, 10 мин) и собирают осажденные бактерии. К бактериям добавляют 50 mM Tris-HCl буфер (pH 8,0), содержащий 5 mM ЭДТА, 0,1 M NaCl и 1%-ный Triton X-100, и бактерии разрушают ультразвуковой обработкой (выход: 4, рабочий цикл: 70%, 1 мин×10 раз). Суспензию разрушенных бактерий центрифугируют (12000×g, 10 мин) для осаждения телец включения. Полученные тельца включения смешивают с 50 mM Tris-HCl буфером (pH 8,0), содержащим 5 mM ЭДТА, 0,1 M NaCl и 4%-ный Triton X-100, и еще раз подвергают ультразвуковой обработке (выход: 4, рабочий цикл: 50%, 30 сек×2 раза) и центрифугируют (12000×g, 10 мин) для того, чтобы 20 отделить требуемый белок в виде осадка и чтобы удалить примесные белки, находящиеся в супернатанте.

Тельца включения, содержащие желаемый белок, лизируют в 50 mM буфере Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 6 M мочевины, 5 mM ЭДТА и 0,1 M NaCl, наносят на гель-25 фильтрационную колонку Sephacryl S-300 (5×90 см, Amersham Pharmacia), уравновешенную 50 mM Tris-HCl буфером (pH 8,0), содержащим 4 M мочевины, 5 mM ЭДТА, 0,1 M NaCl и 10 mM меркаптоэтанол, при скорости подачи 5 мл/мин, для удаления ассоциированных одноцепочечных Fv с большой молекулярной массой. Полученные 30 фракции анализируют с помощью SDS-PAGE; фракции высокой степени гомогенности белка разводят буфером, используемым при гель-фильтрации, до O.D.<sub>280</sub>=0,25. Затем для того, чтобы осуществить повторный фолдинг белка, фракции трижды диализуют против 50 mM буфера Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 5 mM ЭДТА, 0,1 M NaCl, 0,5 M Arg, 2 mM глутатион в восстановленной форме и 0,2 mM глутатион в окисленной форме. Фракции 35 дополнительно трижды диализуют против 20 mM ацетатного буфера (pH 6,0), содержащего 0,15 NaCl, для того чтобы сменить буфер.

Для удаления незначительного количества белка с высокой молекулярной массой, который был поперечно сшит межмолекулярными S-S-связями, диализованный продукт наносят на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 pg (2,6×60 см, Amersham 40 Pharmacia), уравновешенную 20 mM ацетатным буфером (pH 0,6), содержащим 0,15 M NaCl. Как показано на Фиг.24, два пика, главный и минорный, были элюированы после широких пиков, которые, как ожидалось, относятся к агрегату с высокой молекулярной массой. Анализ методом SDS-PAGE (см. Фиг.21) и позиции элюции двух пиков при гель-фильтрационном анализе дают основания полагать, что главный пик принадлежит 45 мономеру одноцепочечного Fv, а минорный - нековалентно связанному димеру одноцепочечного Fv. 4% от всех одноцепочечных Fv составляют нековалентно связанные димеры.

5.13 Апоптоз-индуцирующая активность *in vitro* одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2

50 Апоптоз-индуцирующее действие *in vitro* одноцепочечного Fv, происходящего из антитела MABL-2 (MABL2-scFv), продуцируемого клетками CHO и E.coli., исследуют в соответствии с двумя протоколами, при помощи метода окрашивания Аннексином-V (Boehringer Mannheim), используя клетки L1210 (hIAP/L1210), в которые был введен ген LAP человека.

Согласно первому протоколу образец антител в конечной концентрации 3 мкг/мл добавляют к  $5 \times 10^4$  клеток клеточной линии hIAP/L1210 и культивируют в течение 24 час. Анализируют образец антител, т.е. мономер и димер одноцепочечного Fv MABL-2 из клеток CHO, полученные в Примере 5.9, мономер и димер одноцепочечного Fv MABL-2 из E.coli. 5 полученные в Примере 5.12, и IgG-антитело мыши, взятое в качестве контроля. После культивирования проводят окрашивание Аннексином-V и измеряют интенсивность флуоресценции при помощи прибора FACScan (BECTON DICKINSON).

Согласно второму протоколу образец антител в конечной концентрации 3 мкг/мл добавляют к  $5 \times 10^4$  клеток клеточной линии hIAP/L1210, культивируют в течение 2 час и 10 смешивают с анти-FLAG антителом (SIGMA) в конечной концентрации 15 мкг/мл и дополнительно культивируют в течение 22 час. Анализируют образец антител мономера одноцепочечного Fv из MABL-2 из клеток CHO, полученных в Примере 5.9, и IgG-антитело мыши, взятое в качестве контроля. После культивирования проводят окрашивание Аннексином-V и измеряют интенсивность флуоресценции при помощи FACScan (BECTON 15 DICKINSON).

Результаты анализа с помощью окрашивания Аннексином-V показаны на Фиг.25-31. Данные результаты показывают, что, в сравнении с контрольным образцом (Фиг.25), димеры одноцепочечного Fv полипептида MABL-2, продуцируемые в клетках CHO и E.coli, заметным образом индуцируют клеточную смерть (Фиг.26, 27), в то время как у мономеров 20 одноцепочечного Fv полипептида MABL-2, продуцируемого в клетках CHO и E.coli, такое апоптоз-индуцирующее действие не наблюдается (Фиг.28, 29). При использовании совместно с анти-FLAG антителом, мономер одноцепочечного Fv полипептида, происходящего из MABL-2, продуцированный в клетках CHO, в значительной степени, по сравнению с контрольным образцом, индуцирует клеточную смерть (Фиг.30).

5.14 Противоопухольевый эффект мономера и димера полипептида scFv/CHO на мышинной модели человеческой миеломы

(1) Количественное определение IgG человека в мышинной сыворотке

Количественное определение IgG человека (M-белок), продуцируемого клетками человеческой миеломы и содержащегося в мышинной сыворотке, проводят методом ELISA 30 следующим образом. Вносят в каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) 100 мкл козлиного антитела против IgG человека (BIOSOURCE, Lot#7902), разведенного до концентрации 1 мкг/мл 0,1%-ным бикарбонатным буфером (pH 9,6), и инкубируют при 4°C в течение ночи до иммобилизации антитела. После блокирования в каждую лунку 35 добавляют 100 мкл ступенчато разведенной мышинной сыворотки или IgG человека (CAPPEL, Lot#00915) в качестве эталона и инкубируют в течение 2 час при комнатной температуре. После отмывания добавляют 100 мкл меченного щелочной фосфатазой антитела против IgG человека (BIOSOURCE, Lot#7902), разведенного в 5000 раз, и в течение 1 час проводят инкубацию при комнатной температуре. После отмывания 40 добавляют раствор субстрата. После инкубации измеряют поглощение при 405 нм при помощи MICROPLATE READER Model 3550 (BioRad). Концентрацию IgG человека в сыворотке мыши определяют по калибровочной кривой, построенной по величинам поглощения для IgG человека в качестве стандарта.

(2) Получение антител для введения

Для того, чтобы приготовить образцы для введения, мономер и димер scFv/CHO 45 полипептида разводят до концентрации 0,4 мг/мл или 0,25 мг/мл соответственно стерилизованным фильтрованием PBS(-) непосредственно в день применения.

(3) Получение мышинной модели человеческой миеломы

Мышиную модель человеческой миеломы получают следующим образом. Клетки KPM2, пассированные in vivo (JP-Appl. 7-236475) в мышах SCID (Japan Clare), 50 суспендировали в среде RPMI1640 (GIBCO-BRL), содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку (GIBCO-BRL), и разводили до концентрации  $3 \times 10^7$  клеток/мл. 200 мкл суспензии клеток KPM2 ( $6 \times 10^6$  клеток/мышь) трансплантируют через хвостовую вену мыши SCID (самец, 6-недельный), которой была сделана подкожная инъекция антитела к асиало-GM1

(WAKO JUNYAKU, 1 ампула, растворенная в 5 мл) за день до трансплантации.

(4) Введение антител

Образцы антител, приготовленные в (2), мономер (250 мкл) и димер (400 мкл) вводят в мышинные модели человеческой миеломы, полученные в (3), через хвостовую вену.

5 Начиная введение через три дня после трансплантации клеток и KPM2 и проводят дважды в день в течение трех дней. Контрольной группе аналогичным образом вводят 200 мкл стерилизованного фильтрованием PBS(-) дважды в день в течение трех дней в хвостовую вену. Каждая группа включает по семь мышей.

10 (5) Оценка противоопухолевого эффекта мономера и димера scFv/CHO полипептида на мышинной модели человеческой миеломы

Противоопухолевый эффект мономера и димера scFv/CHO полипептида на мышинной модели человеческой миеломы оценивают по изменению концентрации IgG человека (M-белок) в сыворотке мыши и по времени выживания мыши. Изменение концентрации IgG человека определяют, измеряя ее в мышинной сыворотке, собираемой спустя 24 дня после трансплантации KPM2 клеток, при помощи ELISA, как описано выше (1). Количество сывороточного IgG человека (M-протеин) в сыворотке у той группы (контрольной), которой вводили PBS(-), возросло приблизительно до 8500 мкг/мл, в то время как количество IgG человека в группе, которой вводили димер scFv/CHO, было удивительно низким, а именно оно составляло одну десятую или менее от величины в контрольной 15 группе. Следовательно, данные результаты показывают, что димер scFv/CHO сильно подавляет рост клеток KPM2 (Фиг.32). Как показывает Фиг.33, в группе, которой вводили димер scFv/CHO, наблюдалось значительное увеличение времени выживания по сравнению с группой, которой вводили PBS(-). 20

Все вышеизложенное подтверждает, что димер scFv/CHO оказывает противоопухолевый эффект на мышинной модели человеческой миеломы. Предполагается, что противоопухолевый эффект димера scFv/CHO, модифицированного антитела настоящего изобретения, является результатом апоптоз-индуцирующего действия модифицированного антитела. 25

5.15 Реакция гемагглютинации

30 Реакцию гемагглютинации и определение гемагглютинации выполняют в соответствии с "Immuno-Biochemical Investigation", Zoku-Seikagaku Jikken Koza, изданным the Biochemical Society of Japan, опубликованным Tokyo Kagaku Dojin.

Берут кровь у здорового донора, используя обработанный гепарином шприц, и трижды отмывают PBS(-), а затем готовят суспензию эритроцитов с конечной концентрацией 2% в PBS(-). Для реакции берутся следующие образцы: антитело MABL-2, мономер и димер одноцепочечного Fv полипептида, продуцированного клетками CHO, и мономер и димер одноцепочечного Fv иолипептида, продуцированного E.coli, в качестве контроля берется IgG мыши (ZYMED). Для исследования эффекта гемагглютинации применяются 96-луночные планшеты с круглыми донцами, производимые Falcon. В лунки планшета вносят по 50 мкл на лунку вышеупомянутых образцов антител и по 50 мкл 2%-ной суспензии эритроцитов и перемешивают. После инкубирования при 37°C в течение 2 час реакцию смесь оставляют на ночь при 4°C и определяют в них гемагглютинацию. В качестве контроля используют по 50 мкл PBS(-) на лунку и аналогичным образом осуществляют постановку реакции гемагглютинации. IgG мыши и антитело MABL-2 были использованы в следующих конечных концентрациях антител: 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 или 45 100,0 мкг/мл. Одноцепочечные Fv были использованы в следующих конечных концентрациях антител: 0,004, 0,04, 0,4, 4,0, 40,0 или 80,0 мкг/мл, и дополнительно 160,0 мкг/мл только для димера полипептида, продуцированного E.coli. Результаты приводятся в Таблице 2. Гемагглютинация в случае антитела MABL-2 наблюдается при 50 концентрации, превышающей 0,1 мкг/мл, в то время как в случаях как мономера, так и димера одноцепочечного Fv гемагглютинация не наблюдается.

Таблица 2 Реакции гемагглютинации					
Контроль	0.01	0.1	1	10	100 мкг/мл

MlgG	-	-	-	-	-	-	-	-
MABL-2 (интактное)	-	-	+	+++	+++	++		
	Контроль	0.004	0.04	0.4	4	40	80	мкг/мл
мономер scFv/CHO	-	-	-	-	-	-	-	
димер scFv/CHO	-	-	-	-	-	-	-	
	Контроль	0.004	0.04	0.4	4	40	80	160 мкг/мл
мономер scFv/E.coli	-	-	-	-	-	-	-	
димер scFv/E.coli	-	-	-	-	-	-	-	

5

Пример 6 (модифицированное антитело sc(Fv)<sub>2</sub>, включающее две V-области H-цепи и две V-области L-цепи, и антитело MABL-2 scFv с линкерами различной длины)

10

### 6.1 Конструирование плазмиды, экспрессирующей модифицированное антитело sc(Fv)<sub>2</sub> MABL-2

15

Для получения плазмиды, экспрессирующей модифицированное антитело [sc(Fv)<sub>2</sub>], которое содержит две V-области H-цепи и две V-области L-цепи, происходящие из антитела MABL-2, вышеупомянутую pCHOM2, которая содержит ДНК, кодирующую scFv, происходящую из MABL-2, описанный выше, модифицируют ПЦР-методом, как описано ниже, и встраивают полученный фрагмент ДНК в pCHOM2.

20

Для ПЦР используются следующие праймеры: праймер EF1 (SEQ ID NO.:30) в качестве смыслового праймера, который конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей EF1<sub>α</sub>, и антисмысловый праймер (SEQ ID NO.:19), который конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области L-цепи, и содержал последовательность ДНК, кодирующую область линкера, и праймер VLLAS, содержащий сайт узнавания рестриктазы Sall (SEQ ID NO.31).

25

100 мкл ПЦР-раствора содержит 10 мкл 10-кратного ПЦР-буфера #1, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 единиц ДНК-полимеразы KOD (Toyobo, Inc.), по 1 мкМ каждого праймера и 100 нг матричной ДНК (pCHOM2). ПЦР-раствор последовательно нагревают при 94°C в течение 30 сек, при 50°C в течение 30 сек и при 74°C в течение 1 мин. Данный температурный цикл повторяют 30 раз.

30

ПЦР-продукт очищают при помощи набора QIAquick ПЦР Purification Kit (QIAGEN), а затем расщепляют с помощью Sall. Полученный фрагмент ДНК клонируют в вектор pBluescript KS<sup>+</sup> (Toyobo, Inc.). После секвенирования ДНК плазмиду, содержащую требуемую ДНК-последовательность, расщепляют Sall и при помощи набора Rapid DNA Ligation Kit (BOEHRINGER MANNHEIM), присоединяют полученный ДНК-фрагмент к pCHOM2, расщепленной с помощью Sall. После секвенирования ДНК плазмиду, содержащую искомую ДНК-последовательность, обозначают как "pCHOM2(Fv)<sub>2</sub>" (см. Фиг.34). Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность области антитела sc(Fv)<sub>2</sub> MABL-2, включенной в плазмиду pCHOM2(Fv)<sub>2</sub>, показаны в SEQ ID NO.32.

35

40

### 6.2. Получение плазмиды, экспрессирующей антитела scFv MABL-2, имеющие линкеры различной длины.

scFv, содержащие линкеры различной длины, и V-области, имеющие следующие структуры [H-цепь] - [L-цепь] (далее по тексту "HL") или [L-цепь] - [H-цепь] (далее по тексту "LH"), получают, используя в качестве матриц кДНК, кодирующие H-цепь и L-цепь, происходящие из MABL-2, как это будет описано ниже.

45

Для конструирования scFv типа HL проводят ПЦР, используя в качестве матрицы pCHOM2 (Fv)<sub>2</sub>. На этапе ПЦР применяют пару праймеров CFHL-F1 (SEQ ID NO.:33) и CFHL-R2 (SEQ ID NO.:34) или пару праймеров CFHL-F2 (SEQ ID NO.:35) и CFHL-R1 (SEQ ID NO.:36) и KOD-полимеразу. Для того, чтобы получить кДНК для H-цепи, содержащей лидерную последовательность на 5'-конце или кДНК для L-цепи, содержащей FLAG-последовательность на 3'-конце, проводят последовательность операций ПЦР, повторяя 30 раз температурный цикл, состоящий из нагревания при 94°C в течение 30 сек, 60°C в течение 30 сек и 72°C 1 мин в указанном порядке. Полученные кДНК для H-цепи и L-цепи перемешивают и, используя их смесь как матрицы, а также KOD-полимеразу, проводят ПЦР путем 5-кратного повторения температурного цикла, состоящего из 94°C в течение 30

50

сек, 60°C в течение 30 сек, а потом 72°C в течение 1 мин в указанном порядке. К реакционной смеси добавляют праймеры CFHL-F1 и CFHL-R1 и проводят ПЦР, повторяя вышеуказанный температурный цикл 30 раз, чтобы получить кДНК для HL-0 типа без линкера.

5 Для конструирования scFv типа LH проводят ПЦР, используя в качестве матрицы pGEM-M2L и pGEM-M2H, которые включают кДНК, кодирующие соответственно V-область L-цепи и V-область H-цепи антитела MABL-2 (см. JP-Apl. 11-63557). Используют пару праймеров T7 (SEQ ID NO.:37) и CFLH-R2 (SEQ ID NO.:38) или пару праймеров CFLH-F2 (SEQ ID NO.:39) и CFLH-R1 (SEQ ID NO.:40), и KOD-полимеразу (Toyobo Inc.). Для получения кДНК для L-цепи, содержащей лидерную последовательность на 5'-конце, или кДНК для H-цепи, содержащей FLAG-последовательность на 3'-конце, проводят ПЦР, повторяя 30 раз температурный цикл, состоящий из 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C в указанном порядке. Полученные кДНК для L-цепи и H-цепи смешивают, проводят ПЦР, используя в качестве матрицы полученную смесь и KOD-полимеразу, путем 5-кратного повторения температурного цикла, состоящего из 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C в указанном порядке. К реакционной смеси добавляют праймеры T7 и CFLH-R1 и осуществляют реакцию, повторяя 30 раз вышеупомянутый температурный цикл. Для получения кДНК для LH-0 типа без линкера используют в качестве матрицы продукт реакции и проводят ПЦР с использованием пары праймеров CFLH-F4 (SEQ ID NO.:41) и CFLH-R1 путем повторения 30 раз температурного цикла, состоящего из 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C в указанном порядке.

Полученные кДНК для LH-0 и HL-0 типов расщепляют рестриктазами EcoRI и BamHI (Takara Shuzo) и встраивают расщепленные кДНК в экспрессионную плазмиду INPEP4 для клеток млекопитающих соответственно, используя набор Ligation High (Noyobo Inc.). Компетентные клетки E.coli JM109 (Nippon Gene) трансформируют каждой из плазмид и выделяют желаемые плазмиды из трансформированной E.coli при помощи набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Таким образом получают плазмиды pCF2LH-0 и pCF2HL-0.

Для конструирования экспрессионных плазмид HL-типа, содержащих линкеры разного размера, используют в качестве матрицы pCF2HL-0, в качестве смыслового праймера CFHL-X3 (SEQ ID NO.:42), CFHL-X4 (SEQ ID NO.:43), CFHL-X5 (SEQ ID NO.:44), CFHL-X6 (SEQ ID NO.:45) или CFHL-X7 (SEQ ID NO.:46), и в качестве антисмыслового праймера BGN-1 (SEQ ID NO.:47), который комплементарен векторной последовательности. ПЦР проводят с использованием KOD-полимеразы, повторяя 30 раз температурный цикл, состоящий из 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C в указанном порядке; продукты реакции расщепляют рестриктазами XhoI и BamHI (Takara Shuzo). Расщепленные фрагменты встраивают в pCF2HL-0 соответственно между сайтами XhoI и BamHI, используя набор Ligation High (Toyobo Inc.). Трансформируют компетентные клетки E.coli JM109 каждой из плазмид и с помощью набора Qiagen Plasmid Maxi Kit выделяют требуемые плазмиды из трансформированной E.coli. Таким образом получают экспрессионные плазмиды pCF2HL-3, pCF2HL-4, pCF2HL-5, pCF2HL-6 и pCF2HL-7.

Чтобы сконструировать экспрессионную плазмиду для временной экспрессии в клетках COS7, с помощью рестриктаз EcoRI и BamHI (Takara Shuzo) расщепляют плазмиды pCF2HL-0, pCF2HL-3, pCF2HL-4, pCF2HL-5, pCF2HL-6 и pCF2HL-7 и очищают полученные фрагменты размером приблизительно 800 п.о. с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные фрагменты встраивают, используя набор Ligation High (Toyobo Inc.), соответственно между сайтами EcoRI и BamHI экспрессионной плазмиды pCOS1 для экспрессии в клетках млекопитающих. Трансформируют каждой из плазмид компетентные клетки E.coli DH5 $\alpha$  (Toyobo Inc.) и выделяют из трансформированной E.coli требуемые плазмиды, используя набор Qiagen Plasmid Maxi Kit. Таким образом получают экспрессионные плазмиды pCF2HL-0/pCOS1, pCF2HL-3/pCOS1, pCF2HL-4/pCOS1, pCF2HL-5/pCOS1, pCF2HL-6/pCOS1 и pCF2HL-7/pCOS1.

Фиг.35 иллюстрирует, в качестве типичного примера для данных плазмид, конструирование плазмиды pCF2HL-0/pCOS1, а нуклеотидная последовательность и



аминокислотная последовательность MABL2-scFv <HL-0>, включенные в плазмиду, показаны в SEQ ID NO.:48. Нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности линкерных областей этих плазмид показаны также на Фиг.36.

Для того чтобы сконструировать экспрессионные плазмиды LH-типа, содержащие линкеры разного размера, используют в качестве матрицы pCF2LH-0, в качестве смыслового праймера CFLH-X3 (SEQ ID NO.:49), CFLH-X4 (SEQ ID NO.:50), CFLH-X5 (SEQ ID NO.:51), CFLH-X6 (SEQ ID NO.:52) или CFLH-X7 (SEQ ID NO.:53), и праймер BGH-1 в качестве антисмыслового праймера, который комплементарен векторной последовательности. Проводят ПЦР с использованием KOD-полимеразы, повторяя 30 раз температурный цикл, состоящий из 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C в указанном порядке; продукты реакции расщепляют рестриктазами XhoI и BamHI. Расщепленные фрагменты встраивают соответственно между сайтами XhoI и BamHI в pCF2LH-0, используя набор Ligation High. Каждой из плазмид трансформируют компетентные клетки E.coli DH5a (Toyobo Inc.) и с помощью набора Qiagen Plasmid Maxi Kit выделяют требуемые плазмиды из трансформированной E.coli. Таким образом получают экспрессионные плазмиды pCF2LH-3, pCF2LH-4, pCF2LH-5, pCF2LH-6 и pCF2LH-7.

Чтобы сконструировать экспрессионную плазмиду для временной экспрессии в клетках COS7, с помощью рестриктаз EcoRI и BamHI (Takara Shuzo) расщепляют плазмиды pCF2LH-0, pCF2LH-3, pCF2LH-4, pCF2LH-5, pCF2LH-6 и pCF2LH-7 и очищают полученные фрагменты размером приблизительно 800 п.о. с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные фрагменты встраивают, используя набор Ligation High, соответственно между сайтами XhoI и BamHI экспрессионной плазмиды pCOS1 для экспрессии в клетках млекопитающих. Каждой из плазмид трансформируют компетентные клетки E.coli DH $\alpha$  (Toyobo Inc.) и выделяют из трансформированной E. coli требуемые плазмиды, используя набор Qiagen Plasmid Maxi Kit. Таким образом получают экспрессионные плазмиды CF2LH-0/pCOS1, CF2LH-3/pCOS1, CF2LH-4/pCOS1, CF2LH-5/pCOS1, CF2LH-6/pCOS1 и CF2LH-7/pCOS1.

Фиг.37 иллюстрирует, в качестве типичного примера для данных плазмид, конструирование плазмиды CF2LH-0/pCOS1, а нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность MABL2-scFv <LH-0>, включенные в плазмиду, показаны в SEQ ID NO.:54. Нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности линкерных областей этих плазмид показаны также на Фиг.38.

### 6.3 Экспрессия scFv и sc(Fv)<sub>2</sub> в клетках COS7

(1) Получение культурального супернатанта с использованием сывороточной культуральной среды.

scFv и sc(Fv)<sub>2</sub> HL-типа и LH-типа временно экспрессировались в клетках COS7 (JCRB9127, Japan Health Sciences Foundation). Клетки COS7 пассируют на среде DMEM (GIBCO BRL), содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку (FBS) (HyClone), при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки COS7 трансфицируют векторами CF2HL-0, 3~7/pCOS1 или CF2LH-0, 3~7/pCOS1, полученными в Примере 6.2, или pCHOM2 (Fv)<sub>2</sub> при помощи электропорации с использованием аппарата Gene Pulser (BioRad). ДНК (10 мкг) и 0,25 мл суспензии клеток с концентрацией 2×10<sup>7</sup> клеток/мл в культуральной среде DMEM, содержащей 10%-ную FBS и 5 мМ BES (SIGMA), вносят в кювету. Дают смеси постоять 10 минут и обрабатывают импульсом при 0,17 кВ, при электрической емкости 950 мкФ. Через 10 минут после восстановления при комнатной температуре электропорированные клетки переносят в колбу объемом 75 см<sup>3</sup> с культуральной средой DMEM (10% FBS). После культивирования в течение 72 часов культуральный супернатант собирают и удаляют центрифугированием клеточные фрагменты. Для получения культурального супернатанта (далее по тексту CM), культуральный супернатант фильтруют с помощью насадки для фильтрации с диаметром пор 0,22 мкм (FALCON).

(2) Приготовление культурального супернатанта с использованием бессывороточной культуральной среды

Клетки, трансфицированные таким же образом, как это делается в (1), переносят в колбу объемом 75 см<sup>3</sup> с культуральной средой DMEM (10%FBS) и культивируют в течение ночи. После культивирования супернатант отбрасывают, а клетки отмывают раствором PBS, а затем вносят в среду CHO-S-SFM II (GIBCO BRL). После культивирования в течение 5 72 часов культуральный супернатант собирают, центрифугируют для удаления клеточных фрагментов и фильтруют с помощью насадки для фильтрования с диаметром пор 0,22 мкм (FALCON) для получения CM.

#### 6.4 Обнаружение scFv и sc(Fv)<sub>2</sub> в CM клеток COS7

Различные MABL2-scFvs и sc(Fv)<sub>2</sub> в CM клеток COS7, полученные в приведенном выше 10 Примере 6.3 (2), выявляют методом Western блоттинга.

Каждый CM клеток COS7 подвергают SDS-PAGE и переносят на мембрану REINFORCED NC (Schleicher & Schuell). Мембрану блокируют 5%-ным снятым молоком (Morinaga Nyu-gyo) и отмывают раствором TBS. Затем туда добавляют анти-FLAG антитело (SIGMA). Мембрану инкубируют при комнатной температуре и отмывают. Добавляют 15 меченое пероксидазой IgG-антитело мыши (Jackson Immuno Research). После инкубирования и отмывания при комнатной температуре добавляют раствор субстрата (Kirkegaard Perry Laboratories) для развития окраски (Фиг.39).

#### 6.5 Проточная цитометрия

Для измерения связывания MABL2-scFVs и sc(Fv)<sub>2</sub> с антигеном - 20 интегринассоциированным белком человека (IAP) применяют метод проточной цитометрии, используя культуральные супернатанты клеток COS7, полученные в примере 6.3 (1). Добавляют тестируемые культуральные супернатанты или контрольный культуральный супернатант клеток COS7 к 2×10<sup>5</sup> клеток клеточной линии лейкемии мыши L1210, экспрессирующих человеческий IAP. После инкубирования на льду и отмывания добавляют 25 10 мкг/мл мышиного анти-FLAG антитела (SIGMA), затем клетки инкубируют и отмывают. Затем туда добавляют меченое ФИТЦ антитело против мышиного IgG (BECTON DICKINSON) и клетки еще раз инкубируют и отмывают. Измеряют интенсивность флуоресценции при помощи аппарата FACScan (BECTON DICKINSON). Как показывают 30 результаты проточной цитометрии, MABL2-scFv с линкерами различной длины и sc(Fv)<sub>2</sub> в культуральных супернатантах клеток COS7 имеют высокое сродство к человеческому IAP (см. Фиг.40а и 40b).

#### 6.6 Апоптоз-индуцирующий эффект in vitro

Апоптоз-индуцирующее действие культуральных супернатантов COS7, полученных в 35 Примере 6.3 (1), исследуют при помощи окрашивания Аннексином-V (Boehringer Mannheim) с использованием клеток L1210, трансфицированных геном IAP человека (hIAP/L1210).

К 5×10<sup>4</sup> клеток hIAP/L1210 добавляют культуральные супернатанты клеток COS7, трансфицированных каждым вектором, или культуральный супернатант клеток COS7 в качестве контроля 10%-ной конечной концентрации и культивируют данные смеси в течение 40 24 часов. Затем проводят окрашивание Аннексином-V/PI и определяют интенсивность флуоресценции при помощи аппарата FACScan (BECTON Dickinson). Как показывают результаты, scFv <HL3, 4, 6, 7, LH3, 4, 6, 7> и sc(Fv)<sub>2</sub> в CM клеток COS7 в весьма значительной степени индуцируют клеточную смерть клеток hIAP/L1210. Эти результаты отражены на Фиг.41.

#### 6.7 Конструирование векторов для экспрессии scFv и sc(Fv)<sub>2</sub> в клетках CHO

45 Для выделения и очистки MABL2-scFv и sc(Fv)<sub>2</sub> из культурального супернатанта конструируют экспрессионные векторы для экспрессии в клетках CHO, как описано ниже.

EcoRI-BamHI фрагменты pCF2HL-0, 3~7, и pCF2LH-0, 3~7, полученные в Примере 6.2, встраивают между сайтами EcoRI и BamHI экспрессионного вектора pCHO1 для клеток CHO, используя набор Ligation High. Или трансформируют компетентные клетки E.coli 50 DH5α. Выделяют плазмиды из трансформированной E.coli с помощью набора QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) для получения экспрессионных плазмид pCHOM2HL-0, 3~7 и pCHOM2LH-0, 3~7.

#### 6.8 Получение клеток CHO, экспрессирующих MABL2-scFv <HL-0, 3~7>, MABL2-

scFv <LH-0, 3~7> и sc(Fv)<sub>2</sub>, и получение культуральных супернатантов

Для получения клеток CHO, константно экспрессирующих каждое модифицированное антитело, клетки CHO трансформируют каждой из экспрессионных плазмид pCHOM2HL-0, 3~7, и pCHOM2LH-0, 3~7, сконструированных в Примере 6.7, и вектором pCHOM2 (Fv)<sub>2</sub>. В качестве типичного примера ниже приводится получение CHO-клеток, константно экспрессирующих MABL2-scFv <HL-5> или sc(Fv)<sub>2</sub>.

Экспрессионные плазмиды pCHOM2HL-5 и pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> линеаризируют расщеплением фермента рестриктазами PvuI и трансфицируют в клетки CHO путем электропорации при помощи аппарата Gene Pulser (BioRad). Вносят в кювету ДНК (10 мкг) и 0,75 мл PBS 1×10<sup>7</sup> клеток/мл и обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ. После восстановления при комнатной температуре в течение 10 мин электропорированные клетки переносят в содержащую нуклеиновую кислоту культуральную среду α-MEM (GIBCO BRL), содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку, и культивируют. После культивирования в течение ночи супернатант отбрасывают. Клетки отмывают раствором PBS и переносят в свободную от нуклеиновой кислоты культуральную среду α-MEM (GIBCO BRL), содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку. После культивирования в течение 2 недель клетки культивируют на среде, содержащей 10 нМ (конечная концентрация) метотрексат (SIGMA), затем 50 нМ и 100 нМ метотрексат. Полученные клетки культивируют в бессывороточной CHO-S-SFM II среде (GIBCO BRL) в роллерном флаконе. Затем культуральный супернатант собирают, центрифугированием удаляют клеточные фрагменты и фильтруют соответственно при помощи фильтра с размером пор 0,22 мкм для получения CM.

В соответствии с изложенным выше получают клетки CHO, которые константно экспрессируют MABL2-scFv <HL-0, -3, -4, -6, -7> и <LH-0, -3, -4, -5, -6, -7>, и их CM.

#### 6.9 Очистка димера MABL2-scFv <HL-5> и sc(Fv)<sub>2</sub>

MABL2-scFv <HL-5> и sc(Fv)<sub>2</sub> очищают из CM, полученных в Примере 6.8, используют два способа очистки, приводимых ниже.

##### <Способ очистки 1>

HL-5 и sc(Fv)<sub>2</sub> очищают с помощью хроматографии на колонке с иммобилизованными анти-FLAG антителами с использованием FLAG-последовательности, расположенной на C-конце полипептидов, и с помощью гель-фильтрации. Один литр CM, полученного в 6.8, наносят на колонку (7,9 мл), заполненную гелем anti-FLAG M2 Affinity gel (SIGMA), уравновешенным 50 мМ Tris-HCl буфером (TBS, pH 7,5), содержащим 150 мМ NaCl. После промывания колонки раствором TBS, scFv элюируют буфером 0,1 М глицин-HCl, pH 3,5. Полученные фракции анализируют методом SDS-PAGE и подтверждают элюирование scFv. Смешивают фракцию scFv с Tween 20 с конечной концентрацией 0,01% и концентрируют, используя CENTRICON-10 (MILLIPORE). Концентрат наносят на колонку с TSKgel G3000SWG (7,5×600 мм), уравновешенную 20 мМ ацетатным буфером (pH 6,0), содержащим 150 мМ NaCl и 0,01% Tween 20. При скорости подачи 0,4 мл/мин scFv детектируют по поглощению при 280 нм. HL-5 элюируется в виде основной фракции в положении димера и sc(Fv)<sub>2</sub> элюируется в положении мономера.

##### <Способ очистки 2>

HL-5 и sc(Fv)<sub>2</sub> очищают в три этапа, включающие ионообменную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и гель-фильтрацию. При ионообменной хроматографии используется колонка с Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) для HL-5 и с SP-Sepharose Fast Flow для sc(Fv)<sub>2</sub>. На этапе 2 и после него HL-5 и sc(Fv)<sub>2</sub> обрабатывают по единой схеме.

##### Первый этап для HL-5

CM HL-5 разводят в 2 раза в 20 мМ Tris-HCl буфере (pH 9,0), содержащем 0,02% Tween 20, а затем доводят pH до 9,0 с помощью 1 М Tris. Раствор наносят на колонку Q-Sepharose Fast Flow, уравновешенную 20 мМ Tris-HCl буфером (pH 8,5), содержащим 0,02% Tween 20. Элюируют полипептид, адсорбированный на колонке линейным градиентом NaCl в том же буфере: от 0,1 до 0,55 М. Проводя мониторинг элюируемых фракций методом

SDS-PAGE, отбирают фракции, содержащие HL-5, и на 2 этапе проводят хроматографию на гидроксиапатите.

Первый этап для  $sc(Fv)_2$

CM  $sc(Fv)_2$  разводят 2 раза 20 mM ацетатным буфером (pH 5,5), содержащим 0,02% Tween 20, и доводят его pH до 5,5 с помощью 1 M уксусной кислоты. Раствор наносят на SP-Sepharose Fast Row, уравновешенную 20 mM ацетатным буфером (pH 5,5), содержащим 0,02% Tween 20. Полипептид, адсорбированный на колонке, элюируют линейным градиентом NaCl в буфере: от 0 до 0,5 M. Проводя мониторинг элюируемых фракций методом SDS-PAGE, собирают фракции, содержащие  $sc(Fv)_2$ , и на втором этапе проводят хроматографию на гидроксиапатите.

Второй этап: хроматография HL-5 и  $sc(Fv)_2$  на гидроксиапатите

Фракции HL-5 и  $sc(Fv)_2$ , полученные на этапе 1, отдельно наносят на колонку с гидроксиапатитом (Type I, BIORAD), уравновешенную 10 mM фосфатным буфером, содержащим 0,02% Tween 20, pH 7,0. После промывания колонки тем же буфером элюируют полипептиды, адсорбированные на колонке, линейным градиентом фосфатного буфера до концентрации 0,5 M. Проводя мониторинг элюируемых фракций при помощи SDS-PAGE, собирают фракции, содержащие требуемые полипептиды.

Третий этап: гель-фильтрация HL-5 и  $sc(Fv)_2$

Фракции, полученные на этапе 2, отдельно концентрируют с помощью CentriPrep-10 (MILIPORE) и наносят на колонку Superdex 200 (2,6x60 см, Pharmacia), уравновешенную 20 mM ацетатным буфером (pH 6,0), содержащим 0,02% Tween 20 и 0,15 M NaCl. HL-5 элюируется в положении димера, а  $sc(Fv)HL-5$  и  $sc(Fv)_2$  соответственно элюированы как основные пики в положении мономера.

Поскольку мономер HL-5 практически не обнаруживается при использовании обоих способов очистки, это доказывает, что димеры одноцепочечных Fv образуются с высоким выходом в тех случаях, когда линкер для одноцепочечного Fv содержит около 5 аминокислот. Кроме того, димеры HL-5 и  $sc(Fv)_2$  после очистки стабильно хранятся в течение месяца при 4°C.

6.10 Оценка связывающей активности очищенного димера  $scFv<HL-5>$  и  $sc(Fv)_2$  в отношении антигена

Проводят проточную цитометрию с использованием очищенного димера MABL2- $scFv<HL-5>$  и очищенного  $sc(Fv)_2$ , чтобы оценить связывание с антигеном - интегринассоциированным белком человека (IAP). 10 мкг/мл очищенного димера Mabl2- $scFv<HL-5>$ , очищенного  $sc(Fv)_2$ , антитело Mabl-2 как положительный контроль и мышиный IgG (Zymed) как отрицательный контроль добавляют к  $2 \times 10^5$  клеток клеточной линии лейкемии мыши L1210, экспрессирующей человеческий IAP (hIAP/L1210), или клеточной линии L1210, трансформированной pCOS1 (pCOS1/L1210), в качестве контроля. После инкубирования на льду и отмывания добавляют 10 мкг/мл анти-FLAG антитела мыши (SIGMA) и затем клетки инкубируют и отмывают. К ним добавляют меченное ФИТЦ антитело против мышиного IgG (BECTON DICKINSON) и снова инкубируют клетки и отмывают. Затем измеряют интенсивность флуоресценции, используя аппарат FACScan (BECTON DICKINSON).

Поскольку очищенный димер MABL2- $scFv<HL-5>$  и очищенный  $sc(Fv)_2$  специфически связываются с клетками hIAP/L1210, то этим подтверждается, что димер  $sc(Fv)<HL-5>$  и  $sc(Fv)_2$  имеют высокое сродство к человеческому IAP (см. Фиг.42).

6.11 Апоптоз-индуцирующая активность очищенного димера  $scFv<HL-5>$  и  $sc(Fv)_2$  in vitro

Апоптоз-индуцирующее действие очищенного димера MABL2- $scFv<HL-5>$  и очищенного  $sc(Fv)_2$  исследуют методом окрашивания Аннексином-V (Boehringer Mannheim) с использованием клеток L1210 (hIAP/11210), в которые был введен ген человеческого LAP, и клетки клеточной линии лейкемии человека CCRF-CEM.

К  $5 \times 10^4$  клеток клеточной линии hIAP/L1210 или к  $1 \times 10^5$  клеток клеточной линии CCRF-CEM добавляют различные концентрации очищенного димера MABL2- $scFv <HL-5>$ , очищенного MABL2- $sc(Fv)_2$ , антитела MABL-2 в качестве положительного контроля или IgG

мышь в качестве отрицательного контроля. После культивирования в течение 24 часов проводят окрашивание Аннексином-V и при помощи прибора FACScan (BECTON DICKINSON) измеряют интенсивность флуоресценции. Как показывают результаты, димеры MABL2-scFv <HL-5> и MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub> в сильной степени индуцируют клеточную смерть hIAP/L1210 и CCRF-CEM зависимым от концентрации способом (см. Фиг.43). В результате показано, что димеры MABL2-scFv <HL-5> и MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub> значительно эффективнее индуцируют апоптоз в сравнении с исходным антителом MABL-2.

6.12 Реакция гемагглютинации с очищенным димером scFv <HL-5> и sc(Fv)<sub>2</sub>

Реакцию гемагглютинации ставят, используя различные концентрации очищенного димера scFv <HL-5> и очищенного sc(Fv)<sub>2</sub> в соответствии с Примером 5.15.

Гемагглютинация наблюдалась с антителом MABL-2 в качестве положительного контроля, в то время как в случае с одноцепочечным антителом MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub>, так и в случае MABL2-scFv <HL-5> гемагглютинации не наблюдалось. Помимо этого, никакого существенного различия в гемагглютинации между двумя буферами, использованными в эксперименте с антителом MABL-2, не наблюдалось. Данные результаты отражены в Таблице 3.

		ТАБЛИЦА 3 Реакции гемагглютинации															
		Разбавитель: PBS (мкг/мл)															
	контр.	28.9	14.45	7.225	3.612	1.8063	0.9031	0.4516	0.2258	0.1129	0.0564	0.0282	0.0141	0.0071	0.0035	0.0018	
	MABL2-sc(Fv) <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	контр.	28.0	14.0	7.0	3.5	1.75	0.875	0.4375	0.2188	0.1094	0.0547	0.0273	0.0137	0.0068	0.0034	0.0017	
	MABL2-sc(Fv) <HL5>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	контр.	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049	
	MABL2 (интактный)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	
	mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Разбавитель: ацетатный буфер (мкг/мл)															
	контр.	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049	
	MABL2 (интактный)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

6.13 Противоопухолевое действие очищенных димера scFv <HL-5> и sc(Fv)<sub>2</sub> на мышиную модель человеческой миеломы

Испытывают противоопухолевое действие димера scFv <HL-5> и sc(Fv)<sub>2</sub>, полученных и очищенных в Примерах 6.8 и 6.9. Эксперимент проводят, используя мышиную модель человеческой миеломы, полученной в Примере 5.1, и определяя количество М-белка, продуцируемого клетками человеческой миеломы в мышиную сыворотку, методом ELISA, и наблюдая за временем выживания мышей. Затем оценивают противоопухолевые эффекты димера scFv <HL-5> и sc(Fv)<sub>2</sub> по изменению количества М-белка в мышиную сыворотку и продолжительности выживания мышей.

Для эксперимента HL-5 и sc(Fv)<sub>2</sub> применяют в виде раствора с концентрацией 0,01, 0,1 или 1 мг/мл в растворителе, содержащем 150 mM NaCl, 0,02% Твин и 20 mM ацетатный буфер (pH 6,0), и вводят мышам в дозировках 0,1, 1 или 10 мг/кг. Контрольной группе мышей вводят только растворитель.

Спустя 26 дней после трансплантации клеток человеческой миеломы собирают мышиную сыворотку и измеряют количество М-белка в сыворотке методом ELISA в соответствии с Примером 5.14. Как показывают результаты, количество М-белка в сыворотке мышей обеих групп, которым были введены димер HL-5 и sc(Fv)<sub>2</sub>, уменьшалось зависящим от дозы образом (см. Фиг.44). Помимо этого, наблюдалось значительное увеличение времени выживания в обеих группах, которым были введены HL-5 (Фиг.45) и sc(Fv)<sub>2</sub> (Фиг.46), в сравнении с контрольной группой, которой вводили только растворитель. Как показывают данные результаты, HL-5 и sc(Fv)<sub>2</sub> по изобретению обладают отличным противоопухолевым эффектом in vivo.

Пример 7

Одноцепочечный Fv, включающий V-область H-цепи и V-область L-цепи человеческого антитела 12B5 к человеческому MPL

ДНК, кодирующую V-области человеческого моноклонального антитела 12B5 к человеческому MPL, конструируют следующим образом.

#### 7.1 Конструирование гена, кодирующего V-область H-цепи 12B5

Ген, кодирующий V-область H-цепи человеческого антитела 12B5, связывающегося с человеческим MPL, конструируют путем присоединения нуклеотидной последовательности данного гена (SEQ ID NO.:55) по 5'-концу к лидерной последовательности (SEQ ID NO.:56), происходящей из гена человеческого антитела (Eur. J. Immunol. 1996; 26; 63-69). Сконструированную нуклеотидную последовательность разбивают на 4 олигонуклеотида, содержащих частично перекрывающиеся последовательности длиной 15 п.о. каждая (12B5VH-1, 12B5VH-2, 12B5VH-3, 12B5VH-4). 12 BН5-1 (SEQ ID NO.:57) и 12B5VH-3 (SEQ ID NO.:59) синтезированы в смысловой ориентации, а 12B5VH-2 (SEQ ID NO.:58) и 12B5VH-4 (SEQ ID NO.:60) соответственно в антисмысловой ориентации. После состыковки каждого из синтезированных олигонуклеотидов по соответствующей комплементарности добавляют внешние праймеры (12B5VH-S и 12B5VH-A) для амплификации полноразмерного гена. 12B5VH-S (SEQ ID NO.:61) в качестве прямого праймера конструируют так, чтобы он гибридизовался с 5'-концом лидерной последовательности и содержал сайт узнавания рестриктазы Hind III и последовательность Козака, а 12B5VH-A (SEQ ID NO.:62) конструируют в качестве обратного праймера так, чтобы он гибридизовался с нуклеотидной последовательностью, кодирующей С-конец V-области H-цепи, и содержал донорную последовательность спласинга и сайт узнавания рестриктазы BamHI соответственно.

100 мкл ПЦР-раствора, содержащего 10 мкл 10-кратного буфера PCR Gold Buffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (все от PERIKIN ELMER) и по 2,5 пмоль каждого синтезированного олигонуклеотида (12B5VH-1 до - 4), нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 мин, при 94°C 2 мин, при 55°C 2 мин, при 72°C 2 мин. После двукратного повторения цикла добавляют по 100 пмоль каждого из внешних праймеров 12B5VH-S и 12B5VH-A. Смесь подвергают 35 циклам, состоящим из 30 сек при 94°C, 30 сек при 55°C, 1 мин при 72°C, после чего смесь дополнительно нагревают в течение 5 мин при 72°C.

ПЦР-продукт очищают в 1,5%-ном геле легкоплавкой агарозы (Sigma), расщепляют рестриктазы BamHI и Hind III и клонируют в экспрессионный вектор HEF-gγI для H-цепи человека. После определения последовательности ДНК плазмиду, содержащую правильную последовательность ДНК, обозначают как HEF-12B5VH-gγI.

Расщепляют HEF-12B5VH-gγI рестриктазы EcoRI и BamHI для получения гена, кодирующего 12B5VH, который затем клонируют в экспрессионный вектор pCOS-Fd для Fab H-цепи человека, чтобы получить pFd-12B5H. Экспрессионный вектор для H-цепи Fab человека конструируют, амплифицируя методом ПЦР ДНК (SEQ ID NO.:63), содержащую область интрона, расположенную между генами, кодирующими V-область H-цепи человеческого антитела и константную область, и ген, кодирующий часть константной области человеческой H-цепи, и встраивая ПЦР-продукт в экспрессионный вектор pCOS1 для животных клеток. Константную область H-цепи человека для гена амплифицируют при тех же условиях, что и выше, используя HEF-gγI в качестве матрицы, G1CH1-S (SEQ ID NO.:64) в качестве прямого праймера, который конструировали так, чтобы он гибридизовался с 5'-концевой последовательностью интрона 1 и содержал сайты узнавания рестриктаз EcoRI и BamHI, и G1CH1-A (SEQ ID NO.:65) в качестве обратного праймера, который конструировали так, чтобы он гибридизовался с 5'-концом ДНК CH1-домена константной области H-цепи человека, и содержал последовательность, кодирующую часть шарнирной области, 2 стоп-кодона и сайт узнавания рестриктазы Bgl II.

Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированной варибельной области H-цепи 12B5, включенные в плазмиды HEF-12B5VH-gγI и pFd-12B5H, показаны в SEQ ID NO:66.

#### 7.2 Конструирование гена, кодирующего V-область L-цепи 12B5

Ген, кодирующий V-область L-цепи человеческого антитела 12B5, связывающийся с человеческим MPL, конструируется путем присоединения нуклеотидной последовательности гена (SEQ ID NO.:67) по 5'-концу к лидерной последовательности (SEQ ID NO.:68), происходящей из гена человеческого антитела 3D6 (Nuc. Acid Res. 1990; 18; 4927). Также, как в вышеприведенном примере, сконструированную нуклеотидную последовательность разбивают на 4 олигонуклеотида, содержащих частично перекрывающиеся последовательности длиной 15 п.о. каждая (12B5VL-1, 12B5VL-2, 12B5VL-3, 12B5VL-4) и синтезируют соответственно. 12B5VL-1 (SEQ ID NO.:69) и 12B5VL-3 (SEQ ID NO.:71) имеют смысловую ориентацию, а 12B5VL-2 (SEQ ID NO.:70) и 12B5VL-4 (SEQ ID NO.:72) имеют антисмысловую ориентацию соответственно. После состыковки каждого из синтезированных олигонуклеотидов в соответствии с комплементарностью добавляют внешние праймеры (12B5VL-S и 12B5VL-A) для амплификации полноразмерного гена. 12B5VL-S (SEQ ID NO.:73) как прямой праймер конструируют так, чтобы он гибридизовался с 5'-концом лидерной последовательности и содержал сайт узнавания рестриктазы Hind III и последовательность Козака. 12B5VL-A (SEQ ID NO.:74) как обратный праймер конструируют так, чтобы он гибридизовался с нуклеотидной последовательностью, кодирующей С-конец V-области L-цепи и содержал соответственно донорную последовательность сплайсинга и сайт узнавания рестриктазы BamHI.

По проведении ПЦР, как было упомянуто выше, продукт реакции очищают в 1,5%-ном геле легкоплавкой агарозы (Sigma), расщепляют рестриктазами BamHI и Hind III и клонируют в экспрессионный вектор HEF-gK для L-цепи человека. После определения последовательности ДНК плазмиду, содержащую правильную последовательность ДНК, обозначают как HEF-12B5VL-gK. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированной V-области L-цепи 12B5, включенные в плазмиду HEF-12B5VL-gK, показаны в SEQ ID NO.:75.

### 7.3 Получение реконструированного одноцепочечного Fv (scFv) 12B5

Реконструированный одноцепочечный Fv антитела 12B5 конструируют так, чтобы он имел структуру 12B5УН-линкер-12B5VL и содержал FLAG-последовательность (SEQ ID NO.:76) на С-конце для облегчения детекции и очистки. Реконструированный одноцепочечный Fv 12B5 (sc12B5) конструируют, используя линкерную последовательность, состоящую из 15 аминокислот, представленных (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>.

(1) Получение реконструированного одноцепочечного Fv 12B5 с использованием линкерной последовательности, состоящей из 15 аминокислот

Ген, кодирующий реконструированный одноцепочечный Fv антитела 12B5, содержащий линкерную последовательность, состоящую из 15 аминокислот, конструируют путем соединения V-области H-цепи 12B5, линкерной области и V-области L-цепи 12B5, которые амплифицируют соответственно методом ПЦР. Этот способ схематически представлен на Фиг.47. Для получения реконструированного одноцепочечного Fv 12B5 используется шесть праймеров ПЦР (A-F). Праймеры А, С и Е имеют смысловые последовательности, а праймеры В, D и F - антисмысловые последовательности.

Прямой праймер 12B5-S (праймер А, SEQ ID NO.:77) для V-области H-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с 5'-концом лидерной последовательности H-цепи и содержал сайт узнавания рестриктазы EcoRI. Обратный праймер HuVHJ3 (Праймер В, SEQ ID NO.:78) для V-области H-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области H-цепи.

Прямой праймер RHuJH3 (праймер С, SEQ ID NO.:79) для линкера конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец линкера, и перекрывался с ДНК, кодирующей С-конец V-области H-цепи. Обратный праймер RHuVK1 (праймер D, SEQ ID NO.:80) для линкера конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец линкера, и чтобы перекрывался с ДНК, кодирующей N-конец V-области L-цепи.

Прямой праймер HuVK1.2 (праймер Е, SEQ ID NO.:81) для V-области L-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец V-области L-цепи. Обратный праймер 12B5F-A для V-области L-цепи (праймер F, SEQ ID NO.:82)

конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области L-цепи, и содержал последовательность, кодирующую FLAG пептид (Hopp T.P. et al., Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988), два транскрипционных стоп-кодона и сайт узнавания рестриктазы NotI.

5 На первом этапе ПЦР ставят три реакции, А-В, С-Д и Е-Ф, и три ПЦР-продукта, полученные на этапе 1, состыковывают в соответствии с комплементарностью. После добавления праймеров А и F амплифицируют полную размерную ДНК, кодирующую реконструированный одноцепочечный Fv 12B5, имеющий линкер, состоящий из 15 аминокислот (вторая ПЦР). На первом этапе ПЦР используют в качестве матриц  
10 соответственно плазмиду HEF-12B5H-g<sub>yl</sub> (см. Пример 7.1), кодирующую реконструированную V-область H-цепи 12B5, pSCFVT7-hM21 (гуманизированное антитело ONS-M21) (Ohtomo et al., Anticancer Res. 18 (1998), 4311-4316), содержащую ДНК (SEQ ID NO.:83), кодирующую линкерную область, состоящую из Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-  
15 5883, 1988), и плазмиду HEF-12B5L-g<sub>к</sub> (см. Пример 7.2), кодирующую реконструированную V-область L-цепи 12B5.

В 50 мкл ПЦР-раствора первого этапа содержится 5 мкл 10-кратного буфера ПЦР Gold Buffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM каждого dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (все от PERKIN ELMER) и по 100 пмоль каждого праймера и по 100 нг каждой матричной  
20 ДНК. ПЦР-раствор нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 мин, при 94°C 30 сек, затем при 55°C 30 сек, при 72°C 1 мин. Данный цикл повторяют 35 раз, после чего реакционную смесь дополнительно нагревают при 72°C в течение 5 мин.

ПЦР-продукты А-В, С-Д и Е-Ф состыковывают при помощи второй ПЦР. ПЦР-смесь для  
25 второго этапа объемом 98 мкл, содержащую в качестве матрицы 1 мкл продукта А-В первой ПЦР, 0,5 мкл ПЦР0-продукта С-Д и 1 мкл ПЦР-продукта Е-Ф, 10 мкл 10-кратного буфера ПЦР Gold Buffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM каждого dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (все от PERKIN ELMER), нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 мин, затем при 94°C 2 мин, при 65°C 2 мин, при 72°C 2 мин. После двукратного  
30 повторения данного цикла добавляют по 100 пмоль праймеров А и F. Цикл, состоящий из 94°C в течение 30 сек, 55°C в течение 30 сек, 72°C в течение 1 мин, повторяют 35 раз, после чего реакционную смесь нагревают при 72 °C в течение 5 мин.

Фрагменты ДНК, полученные в ходе второй ПЦР, очищают в 1,5%-ном геле легкоплавкой агарозы (Sigma), расщепляют ферментами EcoRI и NotI и клонируют в вектор pCHO1 и в  
35 вектор pCOS1 (Japanese Patent Application No. 8-255196). Экспрессионный вектор pCHO1 - это вектор, полученный делецией гена антитела из DHFR-ΔE-rvH-PM1-f (см. WO 92/19759) в результате расщепления SmaI и EcoRI и присоединением адаптора EcoRI-NotI-VamHI Adaptor (TAKARA SHUZO). После определения последовательности ДНК плазмиды, содержащие фрагмент ДНК, кодирующий правильную аминокислотную  
40 последовательность реконструированного одноцепочечного Fv 12B5 обозначают как pCHO-sc12B5 и pCOS-sc12B5. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv 12B5, включенные в плазмиды pCHO-sc12B5 и pCOS-sc12B5, представлены в SEQ ID NO.:84.

7.4 Экспрессия антитела 12B5 (IgG, Fab) и одноцепочечного Fv полипептида животной  
45 клеткой

Антитело 12B5 (IgG, Fab) и одноцепочечный Fv, происходящий из антитела 12B5, экспрессируют с использованием клеток COS7 или CHO.

Осуществляется временная экспрессия с использованием клеток COS7 следующим образом. Методом электропорации с использованием аппарата Gene Pulser (BioRad)  
50 осуществляют трансфекцию. Для экспрессии антитела 12B5 (IgG) добавляют по 10 мкг каждого из вышеупомянутых экспрессионных векторов, HEF-12B5H-g<sub>yl</sub> и HEF-12B5L-g<sub>к</sub>, для экспрессии фрагмента 12B5Fab добавляют по 10 мкг pFd-12B5H и HEF-12B5L-g<sub>к</sub> и для экспрессии одноцепочечного Fv 10 мкг pCOS-sc12B5 добавляют к клеткам COS-7



( $1 \times 10^7$  клеток/мл), суспендированных в 0,8 мл PBS. Смесь, помещенную в кювету, обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ. После 10 мин восстановления при комнатной температуре электропорированные клетки переносят в культуральную среду DMEM (GIBCO BRL), содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку, и культивируют. После культивирования в течение ночи клетки отмывают один раз раствором PBS, добавляют к бессывороточной среде CHO-S-SFM II и культивируют в течение 2 дней. Центрифугированием удаляют из культуральной среды клеточный дебрис и фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм для получения культурального супернатанта.

Для получения линии клеток CHO со стабильной экспрессией одноцепочечного Fv (полипептида), происходящего из антитела 12B5, экспрессионный вектор pCHO-sc12B5 вводят в клетки CHO следующим образом.

Экспрессионный вектор вводят в клетки CHO методом электропорации при помощи аппарата Gene Pulser (BioRad). Линеаризованную ДНК (100 мкг), полученную расщеплением рестриктазой PvuI, и клетки CHO ( $1 \times 10^7$  мл), суспендированные 0,8 мл PBS смешивают в кювете, дают постоять на льду в течение 10 мин и обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ. После восстановления в течение 10 мин при комнатной температуре электропорированные клетки добавляют к среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку, и культивируют. После культивации в течение 2 дней культивацию продолжают в среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), содержащей 5 нМ метотриксат (SIGMA) и 10%-ную фетальную бычью сыворотку. Из полученных таким образом клонов отбирают клон с высокой степенью экспрессии в качестве клеточной линии-производителя одноцепочечного Fv 12B5. После культивации в бессывороточной среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), содержащей 5 нМ метотриксат (SIGMA), получают культурный супернатант путем отделения клеточного дебриса центрифугированием.

7.5 Очистка одноцепочечного Fv, происходящего из 12B5, продуцируемого клетками CHO

Культуральный супернатант клеточной линии CHO, экспрессирующей одноцепочечный Fv 12B5, полученный в 7.4, очищают с помощью колонки с анти-FLAG антителом и гель-фильтрационной колонки.

(1) Колонка с анти-FLAG антителом

Культуральный супернатант добавляют к гемо anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA), уравновешенному PBS. После отмывания колонки тем же буфером элюируют белки, адсорбированные на колонке, с помощью 0,1 М глицин-HCl буфера (pH 3,5). Элюированные фракции сразу же нейтрализуют добавлением 1 М Tris-HCl буфера (pH 8,0). Элюированные фракции анализируют методом SDS-PAGE и концентрируют при помощи Centricon-10 (MILLIPORE) ту фракцию, в которой подтвердилось наличие одноцепочечного Fv.

(2) Гель-фильтрация

Концентрированный раствор, полученный в (1), наносят на колонку Superdex200 (10x300 мм, AMERSHAM PHARMACIA), уравновешенную PBS, содержащим 0,01%-ный Tween 20. Продукт sc12B5 элюируется двумя пиками (А, В) (см. Фиг.48). Фракции А и В анализируют, используя 14%-SDS-полиакриламидный гель. Электрофорез образца осуществляют по методу Лэммли (Laemmli) в присутствии и в отсутствие восстанавливающего агента и окрашивают с помощью Кумасси Бриллиантовым Голубым после электрофореза. Как показано на Фиг.49, фракции А и В, независимо от наличия или отсутствия восстанавливающего агента, дают единственную полосу с кажущимся молекулярным весом около 31 кДа. При анализе фракций А и В методом гель-фильтрации с использованием Superdex200 PC 3,2/30 (3,2x300 мм, AMERSHAM PHARMACIA) фракция А дает продукт, элюируемый с кажущимся молекулярным весом около 44 кДа, а фракция В с около 22 кДа (см. Фиг.50а и 50b). Как показывают результаты, фракция А является димером одноцепочечного Fv sc12B5 с нековалентной связью, а В является мономером.

7.6 Измерение ТРО-подобной агонистической активности различных одноцепочечных Fv

ТРО-подобную активность одноцепочечного анти-MPL антитела оценивают, измеряя пролиферативную активность в отношении Ва/F3 клеток (ВаF/mpl), экспрессирующих человеческий ТРО-рецептор (MPL). После двукратного отмывания ВаF/Mpl клеток культуральной средой RPM11640 (GIBCO), содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку (GIBCO), клетки суспендируют в культуральной среде при плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Одноцепочечное анти-MPL антитело и человеческий ТРО (R&D Systems) разводят соответственно культуральной средой. 50 мкл клеточной суспензии и 50 мкл разведенного антитела или человеческого ТРО вносят в лунки 96-луночного микропланшета (плоскодонного) (Falcon) и культивируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (концентрация CO<sub>2</sub> 5%) в течение 24 часов. После инкубации добавляют 10 мкл реагента WST-8 (реагент для определения числа живых клеток SF: Nacalai Tesque) и сразу же измеряют поглощение при длине волны измерения 450 нм и опорной длине волны 620 нм с помощью флуоресцентно-абсорбционного фотометра SPECTRA Fluor (TECAN). После инкубирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (концентрация CO<sub>2</sub> 5%) в течение 2 часов снова измеряют поглощение при длине волны измерения 450 нм и опорной длине волны 620 нм с помощью SPECTRA Fluor. Поскольку реагент WST-8 развивает окраску при длине волны 450 нм в зависимости от числа живых клеток, то пролиферативную активность ВаF/Mpl оценивают по изменению поглощения за 2 часа с помощью ED50, который рассчитывают следующим образом. На графике пролиферации, по ординате которого откладывают поглощение, а по абсциссе - концентрацию антитела, поглощение на плато принимают за 100% скорости реакции. Пользуясь формулой линейного приближения на основании отложенных на графике значений, близких к 50% скорости реакции, рассчитывают концентрацию антитела, соответствующую 50% скорости реакции, и принимают ее за ED50.

Результаты определения агонистической активности в отношении MPL с использованием культуральных супернатантов клеток COS-7, экспрессирующих различные молекулы антитела 12B5, отражены на Фиг.51, где показано, что 12B5IgG, имеющий бивалентный антигенсвязывающий центр, увеличивает поглощение зависимым от концентрации образом и обладает ТРО-подобной агонистической активностью (ED50; 29 нМ), в то время как агонистическая активность 12B5Fab, имеющего моновалентный антигенсвязывающий центр, оказалась очень слабой (ED50; 34724 нМ). В противоположность этому одноцепочечный Fv (sc12B5), имеющий, подобно Fab, моновалентный антигенсвязывающий центр, проявляет высокую агонистическую активность с ED50, равным 75 нМ. Однако, как известно, переменные области Н-цепи и L-цепи одноцепочечного Fv связаны нековалентной связью и, следовательно, в растворе каждая переменная область диссоциирует и может связываться с переменной областью другой молекулы с образованием мультимеров, например димеров. При измерении молекулярного веса sc12B5, очищенного гель-фильтрацией, было установлено, что в нем присутствуют молекулы, которые были признаны мономерами и димерами (см. Фиг.48). Затем изолируют мономер sc12B5 и димер sc12B5 (см. Фиг.50) и измеряют их агонистическую активность в отношении MPL. Как показано на Фиг.51 и 52, ED50 мономера sc12B5 составляет 4438,7 нМ, что подтверждает, что его агонистическая активность оказывается более низкой по сравнению с результатами, полученными с культуральным супернатантом клеток COS-7. И наоборот, одноцепочечный Fv (димер sc12B5), имеющий бивалентный антигенсвязывающий центр, проявляет агонистическую активность (ED50; 10,1 нМ) в 400 раз более высокую, чем у моновалентного sc12B5. Помимо того, бивалентный одноцепочечный Fv проявляет агонистическую активность, эквивалентную или более высокую, чем агонистическая активность человеческого ТРО или 12B5IgG.

#### Пример 8

Конструирование гена, кодирующего переменную область человеческого антитела 12E10 к человеческому MPL

ДНК, кодирующую переменную область моноклонального антитела 12E10 человека к человеческому MPL, конструируют следующим образом.

##### 8.1 Конструирование гена, кодирующего V-область Н-цепи 12E10

Нуклеотидную последовательность SEQ ID NO.:86 конструируют на основе аминокислотной последовательности, описанной в WO 99/10494 (SEQ ID NO.:85), как ген, кодирующий V-область H-цепи человеческого антитела 12E10, связывающегося с человеческим MPL. Полноразмерную нуклеотидную последовательность получают

5 присоединением к ее 5'-концу лидерной последовательности (SEQ ID NO.:87), происходящей из гена человеческого антитела (GenBank accession NO.AF062252). Сконструированную нуклеотидную последовательность разбивают на 4 олигонуклеотида, имеющих перекрывающиеся последовательности длиной 15 п.о. каждая (12E10VH1, 12E10VH2, 12E10VH3, 12E10VH4). 12E10VH1 (SEQ ID NO.:88) и 12E10VH3 (SEQ ID NO.:90)

10 синтезируют в смысловой ориентации, а 12E10VH2 (SEQ ID NO.:89) и 12E10VH4 (SEQ ID NO.:91) в антисмысловой ориентации соответственно. После состыковки каждого из синтезированных олигонуклеотидов в соответствии с комплементарностью добавляют внешние праймеры (12E10VHS и 12E10VHA) для амплификации полноразмерного гена. 12E10VHS (SEQ ID NO.:92) в качестве прямого праймера конструируют так, чтобы он

15 гибридизовался с 5'-концом лидерной последовательности и содержал сайт узнавания рестриктазы Hind III и последовательность Козака, а 12E10VHA (SEQ ID NO.:93) в качестве обратного праймера конструируют так, чтобы он гибридизовался с нуклеотидной последовательностью, кодирующей C-конец V-области H-цепи и содержал донорскую последовательность сплайсинга и сайт узнавания рестриктазы BamHI соответственно.

20 100 мкл ПЦР-раствора, содержащего 10 мкл 10-кратного буфера ПЦР GOLD Buffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (все от PERKJN ELMER) и по 2,5 пмоль каждого из синтезированных олигонуклеотидов (12E10VH-1 до - 4), нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 мин, затем при 94°C 2 мин, при 55°C 2 мин и при 72°C 2 мин. После двукратного

25 повторения цикла добавляют по 100 пмоль каждого из внешних праймеров 12E10VHS и 12E10VHA. Смесь подвергают циклу, включающему 94°C в течение 30 сек, 55°C в течение 30 сек, 72°C в течение 1 мин, который повторяют 35 раз, после чего дополнительно нагревают при 72°C в течение 5 мин.

30 ПЦР-продукт очищают в 1,5%-ном геле с легкоплавкой агарозой (Sigma), расщепляют ферментами - рестриктазами BamHI и Hind III - и клонируют в экспрессионный вектор HEF-gγI для H-цепи человека. После определения ДНК-последовательности плазмиду, содержащую правильную ДНК-последовательность, обозначают как HEF-12E10H-gγI.

35 HEF-12E10H-gγI расщепляют рестриктазами EcoRI и BamHI для того, чтобы получить ген, кодирующий 12E10VH, и затем его клонируют в экспрессионный вектор для H-цепи Fab человека, pCOS-Fd, для получения pFd-12E10H. Экспрессионный вектор для H-цепи Fab человека получают, амплифицируя ДНК (SEQ ID NO.:63), содержащую область интрона, находящуюся между генами, кодирующими V-область H-цепи антитела человека и константную область, и ген, кодирующий часть константной области H-цепи человека,

40 методом ПЦР и встраивая ПЦР-продукт в экспрессионный вектор для животных клеток pCOS1. Константную область H-цепи человека амплифицируют для получения гена при тех же условиях, которые были описаны выше, используя в качестве матрицы HEF-gγI, в качестве прямого праймера G1CH1-S (SEQ ID NO.:64), который конструировали так, чтобы он гибридизовался с 5'-концом последовательности интрона 1 и содержал сайты узнавания

45 рестриктазы EcoRI и BamHI, и в качестве обратного праймера - G1CH1-A (SEQ ID NO.:65), который конструировали так, чтобы он гибридизовался с 3'-концом ДНК CH1-домена константной области H-цепи человека и содержал последовательность, кодирующую часть шарнирной области, два стоп-кодона и сайт узнавания рестриктазы Bgl II.

50 Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированной варибельной области H-цепи 12E10, которые были включены в плазмиды HEF-12E10H-gγI и pFd-12E10H, приведены в SEQ ID NO.:94.

## 8.2 Конструирование гена, кодирующего V-область L-цепи 12E10

Нуклеотидную последовательность SEQ ID NO.:96 конструируют на основе

аминокислотной последовательности, описанной в WO 99/10494 (SEQ ID NO.:95) как ген, кодирующий V-область L-цепи человеческого антитела 12E10, связывающегося с человеческим MPL. Далее его конструкция включает присоединение к его 5'-концу лидерной последовательности (SEQ ID NO.:97), происходящей из гена человеческого антитела (Mol. Immunol. 1992; 29: 1515-1518). Таким же образом, как описано выше, сконструированную нуклеотидную последовательность разбивают на 4 олигонуклеотида, имеющих перекрывающиеся последовательности по 15 п.о. каждая (12E10VL1, 12E10VL2, 12E10VL3, 12E10VL4), и синтезируют соответственно. 12E10VL1 (SEQ ID NO.:98) и 12E10VL3 (SEQ ID NO.:100) содержат смысловые последовательности, а 12E10VL2 (SEQ ID NO.:99) и 12E10VL4 (SEQ ID NO.:101) содержат соответственно антисмысловые последовательности. После состыковки каждого из синтезированных олигонуклеотидов в соответствии с комплементарностью, добавляют внешние праймеры (12E10VLS и 12E10VEA) для амплификации полноразмерного гена. 12E10VLS (SEQ ID NO.:102) как прямой праймер конструируют так, чтобы он гибридизовался с 5'-концом лидерной последовательности и содержал сайт узнавания рестриктазы EcoRI и последовательность Козака. 12E10VLA (SEQ ID NO.:103) в качестве обратного праймера конструируется так, чтобы он гибридизовался с нуклеотидной последовательностью, кодирующей С-конец V-области L-цепи и содержал сайт узнавания рестриктазы BlnI.

После проведения ПЦР, как описано выше, ПЦР-продукт очищают в 1,5%-ном геле легкоплавкой агарозы (Sigma), расщепляют рестриктазами EcoRI и BlnI и клонируют в рUC19, содержащую ген константной области ламбда-цепи человека. После определения ДНК-последовательности плазмиду, содержащую правильную ДНК-последовательность, расщепляют EcoRI для получения гена, кодирующего V-область L-цепи 12E10 и константную область ламбда-цепи человека, а затем встраивают в экспрессионный вектор pCOS1. Плазмиду, содержащую ген L-цепи 12E10 (SEQ ID NO.:104), обозначают как pCOS-12E10L.

### 8.3 Получение реконструированного одноцепочечного Fv 12E10

Реконструированный одноцепочечный Fv антитела 12E10 конструируют так, чтобы его структура была следующей: 12E10VH-линкер-12E10VL, и чтобы он содержал FLAG-последовательность (SEQ ID NO.:105) на С-конце для облегчения детекции и очистки. Реконструированные одноцепочечные Fv 12E10 (sc12E10 и db12E10) конструируют, используя линкерную последовательность, состоящую из 15 аминокислот, представленных (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, или из 5 аминокислот, представленных (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub>.

(1) Получение реконструированного одноцепочечного Fv 12E10 с использованием линкерной последовательности, состоящей из 5 аминокислот.

Ген, кодирующий реконструированный одноцепочечный Fv 12E10, содержащий линкерную последовательность, состоящую из 5 аминокислот, конструируют путем введения нуклеотидной последовательности для линкера (Gly<sub>4</sub>Ser) в 3'-концевое положение гена, кодирующего V-область H-цепи 12E10, и в 5'-концевое положение гена, кодирующего V-область L-цепи 12E10, амплификации полученного таким образом соответствующего гена методом ПЦР и состыковки амплифицированных генов. Для получения реконструированного одноцепочечного Fv 12E10 используют четыре ПЦР праймера (A-D). Праймеры A и C имеют смысловые последовательности, а праймеры B и D антисмысловые последовательности.

В качестве прямого праймера для V-области H-цепи используют 12E10S (праймер A, SEQ ID NO.:106). Обратный праймер DB2 (праймер B, SEQ ID NO.:107) для V-области H-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области H-цепи, и содержал нуклеотидную последовательность, кодирующую линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub>, и нуклеотидную последовательность, кодирующую N-конец V-области L-цепи.

Прямой праймер DB1 (праймер C, SEQ ID NO.:108) для V-области L-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец V-области L-цепи и содержал нуклеотидную последовательность, кодирующую линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub>, и нуклеотидную последовательность, кодирующую С-конец V-области H-цепи. Обратный праймер 12E10FA

(праймер D, SEQ ID NO.:109) для V-области L-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области L-цепи, и содержал нуклеотидную последовательность, кодирующую FLAG и сайт узнавания рестриктазы NotI.

На первом этапе ПЦР проводят две реакции А-В и С-Д и два ПЦР-продукта, полученных на первом этапе ПЦР, состыковывают в соответствии с комплементарностью. После добавления праймеров А и D амплифицируют полную размерную ДНК, кодирующую реконструированный одноцепочечный Fv 12E10, содержащий линкер, состоящий из 5 аминокислот (второй этап ПЦР). На первом этапе ПЦР в качестве матриц используют соответственно плазмиду HEF-12E10H-gyl (см. Пример 8.1), кодирующую V-область H-цепи 12E10, и pCOS-12E10L (см. Пример 8.2), кодирующую реконструированную V-область L-цепи 12E10.

50 мкл ПЦР-раствора первого этапа содержали 5 мкл 10-кратного буфера ПЦР Gold Buffer II, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,08 мМ каждого из dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (все от PERKIN ELMER), по 100 пмоль каждого праймера и по 100 нг каждой матричной ДНК. ПЦР-раствор нагревают при начальной температуре 94°C в течение 9 минут, затем при 94°C в течение 30 сек, при 55°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 1 мин. После повторения цикла 35 раз реакционную смесь дополнительно нагревают при 72°C в течение 5 мин.

Продукты ПЦР-реакции А-В (429 п.о.) и С-Д (395 п.о.) состыковывают во второй ПЦР. ПЦР-смесь 2 этапа (98 мкл), содержащую по 1 мкл каждого из ПЦР-продуктов А-В и С-Д первого этапа в качестве матриц, по 100 пмоль каждого из праймеров, 10 мкл 10-кратного буфера ПЦР Gold Buffer II, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,08 мМ каждого dNTP, 5 единиц ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (все от PERKIN ELMER), подвергают реакции в тех же условиях, что были упомянуты выше.

Фрагмент ДНК (795 п.о.), полученный на втором этапе ПЦР, очищают в 1,5%-ном геле легкоплавкой агарозы, расщепляют рестриктазами EcoRI и NotI и клонируют в вектор pCHO1 или в вектор pCOS1. Экспрессионный вектор pCHO1 - это вектор, полученный делецией гена антитела из DHFR-ΔE-RVH-PM1-f (см. WO 92/19759) в результате расщепления рестриктазами EcoRI и SmaI и присоединением адаптора EcoRI-NotI-BamHI (TAKARA SHUZO). После определения ДНК-последовательности плазмиды, содержащие ДНК-фрагмент, кодирующий правильную аминокислотную последовательность реконструированного одноцепочечного Fv 12B5, обозначают как pCHO-db12E10 и pCOS-db12E10. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv 12E10, включенные в плазмиды pCHO-db12E10 и pCOS-db12E10, приведены в SEQ ID NO.:110.

(2) Получение реконструированного одноцепочечного Fv 12E10 с использованием линкерной последовательности, состоящей из 15 аминокислот

Ген, кодирующий реконструированный одноцепочечный Fv 12E10, который содержит линкерную последовательность, состоящую из 15 аминокислот, конструируют путем введения нуклеотидной последовательности линкера (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> в 3'-концевое положение гена, кодирующего V-область H-цепи 12E10, и в 5'-концевое положение гена, кодирующего V-область L-цепи 12E10, амплификации полученных таким образом генов методом ПЦР и состыковки амплифицированных генов. Для получения реконструированного одноцепочечного Fv 12E10 используют 4 ПЦР-праймера (А-Д). Праймеры А и С имеют смысловые последовательности, а праймеры В и D имеют антисмысловые последовательности.

Прямой праймером для V-области H-цепи является 12E10S (Праймер А, SEQ ID NO.: 106). Обратный праймер sc4.3 (Праймер В, SEQ ID NO.111) для V-области H-цепи конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области H-цепи и содержал нуклеотидную последовательность, кодирующую линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, и нуклеотидную последовательность, кодирующую N-конец V-области L-цепи.

Прямой праймер sc1.3 (Праймер С, SEQ ID NO.:112) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей N-конец V-области L-цепи, и содержал нуклеотидную

последовательность, кодирующую линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, и нуклеотидную последовательность, кодирующую С-конец V-области Н-цепи. Обратный праймер 12E10FA (Праймер D, SEQ ID NO.:109) конструируют так, чтобы он гибридизовался с ДНК, кодирующей С-конец V-области L-цепи, и содержал нуклеотидную последовательность, кодирующую FLAG сайт узнавания рестриктазы и NotI.

На первом этапе ПЦР осуществляют две реакции А-В и С-Д, и два ПЦР-продукта, полученные на первом этапе ПЦР, состыковывают в соответствии с комплементарностью. После добавления праймеров А и D амплифицируют (вторая ПЦР) полноразмерную ДНК, кодирующую реконструированный одноцепочечный Fv 12E10, содержащий линкер, состоящий из 15 аминокислот. На первом этапе ПЦР в качестве матрицы используют плазмиду pCOS-db12E10 (см. Пример 8.3 (1)), кодирующую реконструированный одноцепочечный Fv 12E10.

В 50 мкл раствора для первого этапа ПЦР содержится 5 мкл 10-кратного буфера ExTaq, 0,4 мМ каждого из dNTP, 2,5 единицы ДНК-полимеразы TaKaRa ExTaq (от TAKARA), и по 100 пмоль каждого праймера и по 10 нг каждой матричной ДНК. ПЦР-раствор нагревают при начальной температуре 94°C в течение 30 сек, затем при 94°C в течение 15 сек, при 72°C в течение 2 мин и данный цикл повторяют 5 раз. После 28-кратного повторения цикла, состоящего из нагревания при 94°C в течение 15 сек и при 70°C в течение 2 мин, реакционную смесь дополнительно нагревают при 72°C в течение 5 мин.

ПЦР-продукты А-В (477 п.о.) и С-Д (447 п.о.) состыковывают во второй ПЦР. Реакционную смесь для второго этапа ПЦР (98 мкл), содержащую 1 мкл каждого из продуктов А-В и С-Д первой ПЦР в качестве матриц, по 100 пмоль каждого из праймеров А и D, 5 мкл 10-кратного буфера ExTaq, 0,4 мМ каждого dNTP, 2,5 единицы ДНК полимеразы TaKaRa ExTaq (TAKARA) подвергают реакции в тех же условиях, что описаны выше.

ДНК-фрагмент (825 п.о.), полученный во второй ПЦР, очищают в 1,0%-ном геле легкоплавкой агарозы, расщепляют рестриктазами EcoRI и NotI. Полученный таким образом ДНК-фрагмент клонируют в вектор pCHO1 или в вектор pCOS1. После определения последовательности ДНК плазмиды, содержащие ДНК-фрагмент, кодирующий правильную аминокислотную последовательность реконструированного одноцепочечного Fv 12E10, обозначают как pCHO-sc12E10 и pCOS-sc12E10. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность реконструированного одноцепочечного Fv 12E10, включенные в плазмиды pCHO-sc12E10 и pCOS-sc12E10, приведены в SEQ ID NO:113.

8.4 Экспрессия антитела 12E10 (IgG, Fab) и одноцепочечного Fv-полипептида в животных клетках

Антитело 12E10 (IgG, Fab) и одноцепочечный Fv, происходящий из антитела 12E10 (линкерная последовательность из 5 аминокислот, из 15 аминокислот), экспрессируют с использованием клеток COS-7 или CHO.

Временная экспрессия с применением клеток COS-7 осуществляется следующим образом. Методом электропорации с использованием аппарата Gene Pulser II (BioRad) осуществляют трансфекцию. Для экспрессии антитела 12E10 (IgG) добавляют по 10 мкг каждого из вышеупомянутых экспрессионных векторов, HEF-12E10H-gyl и pCOS-12E10L, для экспрессии фрагмента 12E10Fab добавляют по 10 мкг pFd-12E10H и pCOS-12E10L и для экспрессии одноцепочечного Fv pCOS-sc12E10 (10 мкг) или pCOS-db 12E10 (10 мкг) добавляют к клеткам COS-7 ( $1 \times 10^7$  клеток/мл), суспендированных в 0,8 мл PBS. Смесь, помещенную в кювету, обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ. После 10 мин восстановления при комнатной температуре электропорированные клетки помещают в среду DMEM (GIBCO BRL), содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку, и культивируют. После культивирования в течение ночи клетки отмывают один раз раствором PBS, добавляют к бессывороточной среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL) и культивируют в течение 3 дней. Центрифугированием удаляют из культурального супернатанта клеточный дебрис и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Для получения клеточной линии CHO, стабильно экспрессирующей одноцепочечный Fv

(полипептид), происходящий из антитела 12E10, экспрессионный вектор pCHO-sc12E10 или pCHO-ds12E10 вводят в клетки CHO следующим образом.

Каждый экспрессионный вектор вводят в клетки CHO методом электропорации при помощи аппарата Gene Pulser II (BioRad). Линейаризованную ДНК (100 мкг), полученную расщеплением рестриктазой PvuI, и клетки CHO ( $1 \times 10^7$  клеток/мл), суспендированных в виде взвеси в 0,8 мл PBS, смешивают в кювете, дают постоять на льду в течение 10 мин и обрабатывают импульсом при 1,5 кВ, при электрической емкости 25 мкФ. После восстановления в течение 10 мин при комнатной температуре электропорированные клетки добавляют к среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку и нуклеиновую кислоту, и культивируют. После культивирования в течение 2 дней культивирование продолжают в свободной от нуклеиновой кислоты среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), содержащей 10%-ную диализированную фетальную бычью сыворотку. Из полученных таким образом клонов отбирают клон с высокой степенью экспрессии в качестве клеточной линии-продуцента одноцепочечного Fv 12E10. После культивирования в бессывороточной среде CHO-S-SFM II (GIBCO BRL), культурный супернатант центрифугируют для удаления клеточного дебриса и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

8.5 Очистка одноцепочечного Fv, происходящего из 12E10, продуцируемого клетками CHO

Культуральные супернатанты, продуцируемые линиями клеток CHO, экспрессирующими одноцепочечные Fv 12E10 (sc12E10, db12E10), полученные в Примере 8.4, очищают с помощью колонки с анти-FLAG антителом и гель-фильтрационной колонки соответственно, для того чтобы получить очищенные одноцепочечные Fv.

(1) Очистка с помощью колонки с анти-FLAG антителом

Каждый культуральный супернатант (sc12E10, db12E10) наносили на колонку с anti-FLAG M2 Affinity gel (SIGMA), уравновешенную 50 мМ Tris-HCl буфером (pH 7,4), содержащим 150 мМ NaCl. После отмывания колонки тем же буфером, элюируют белки, адсорбированные на колонке, с помощью 100 мМ глицинового буфера (pH 3,5). Элюированные фракции сразу же нейтрализуют добавлением 1 М Tris-HCl буфера (pH 8,0) и анализируют методом SDS-PAGE. Те фракции, в которых подтвердилось наличие одноцепочечного Fv, объединяют и концентрируют в 20 раз при помощи Centricon-10 (AMICON).

(2) Гель-фильтрация

Концентрированный раствор, полученный в (1), наносят на колонку Superdex200 HR (10×300 мм, AMERSHAM PHARMACIA), уравновешенную PBS, содержащим 0,01%-ный Tween 20. Хроматограммы приведены на Фиг.53 и 54. Продукт sc12E10 элюируется двумя пиками (A, B) (см. Фиг.53). Продукт db12E10 элюируется двумя пиками (C, D) (см. Фиг.54). Фракцию каждого пика собирают, обрабатывают в присутствии и в отсутствие восстанавливающего агента и проводят электрофорез по методу Лэммли и после электрофореза окрашивают Кумасси Бриллиантовым Голубым. Как показано на Фиг.55, все фракции A, B, C и D, независимо от наличия или отсутствия восстанавливающего агента, дают единственную полосу, имеющую кажущийся молекулярный вес около 31 кДа. При анализе этих фракций методом гель-фильтрации с использованием Superdex200 HR, фракция A дает продукт, элюируемый с кажущимся молекулярным весом около 42 кДа, фракция B 20 кДа (см. Фиг.56), фракция C 69 кДа и фракция D 41 кДа (см. Фиг.57). Как показывают результаты, происходящая из sc12E10 фракция является димером одноцепочечного Fv с нековалентной связью, и фракция B - мономером одноцепочечного Fv, а происходящая из db12E10 фракция C является тримером одноцепочечного Fv с нековалентной связью и фракция D - димером одноцепочечного Fv с нековалентной связью.

8.6 Измерение ТРО-подобной агонистической активности различных одноцепочечных Fv

ТРО-подобную активность одноцепочечного антитела к mPl оценивают, измеряя пролиферативную активность в отношении клеток Ва/F3 (ВаF/mPl), экспрессирующих

человеческий TPO-рецептор (MPL).

После двукратного отмывания клеток BaF/mp1 средой RPMI1640 (GIBCO), содержащей 1%-ную фетальную бычью сыворотку (GIBCO), клетки суспендируют в среде при плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Одноцепочечное к MPL антитело или TPO человека (R&D Systems) соответственно разводят в среде. 50 мкл клеточной суспензии и 50 мкл разведенного антитела или человеческого TPO вносят в лунки 96-луночного микропланшета (с плоским дном) (Corning) и культивируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (концентрация CO<sub>2</sub> 5%) в течение 24 часов. После инкубирования добавляют 10 мкл реагента WST-8 (реагент для измерения количества живых клеток SF: Nacalai Tesque) и сразу же измеряют поглощение при длине волны измерения 450 нм и опорной длине волны 655 нм при помощи абсорбционного фотометра Benchmark Plus (BioRad). После инкубирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (концентрация CO<sub>2</sub> 5%) в течение двух часов снова при помощи Benchmark Plus измеряют поглощение при длине волны измерения 450 нм и опорной длине волны 655 нм. Поскольку реагент WST-8 развивает окраску при длине волны 450 нм в зависимости от числа живых клеток, то пролиферативная активность BaF/mp1 оценивается на основании изменения поглощения за 2 часа.

Агонистическая активность в отношении MPL, измеренная с использованием культуральных супернатантов клеток COS-7, экспрессирующих различные молекулы антитела 12E10, представлена на Фиг.58. Одноцепочечные Fv, имеющие линкер из 5 аминокислот (ds12E10) и линкер из 15 аминокислот (sc12E10), увеличивали поглощение, зависимым от концентрации образом, демонстрируя TPO-подобную агонистическую активность (ED50; 9 пМ и 51 пМ соответственно), в то время, как 12E10IgG и 12E10Fab не проявляли активности.

Как известно, N-цепь и L-цепь одноцепочечного Fv образуют связи не только внутри молекулы, но также и между молекулами с образованием мультимеров, например димеров. Затем культуральный супернатант клеток CHO, экспрессирующих одноцепочечные Fv 12E10, подвергают гель-фильтрации и исследуют на агонистическую активность в отношении MPL. Результаты показаны на Фиг.59. Димер, содержащийся в sc12E10 в малом количестве, проявил TPO-подобную агонистическую активность (димер sc12E10, ED50; 1,9 пМ, в 5000 раз превышающую активность мономера (мономер sc12E10, ED50; >10 нМ). Эта активность выше, чем у TPO (ED50; 27 пМ). Димер db12E10 (димер db 12E10, ED50; 2,0 пМ) продемонстрировал более высокую активность сравнительно с димером sc12E10. Тример db12E10 (ED50; 7,4 пМ), который предположительно являлся тримером на основании молекулярного веса, определенного гель-фильтрацией, обладает высокой активностью, которая оказалась ниже, чем активность димера db12E10. На основе полученных результатов можно полагать, что для активности антитела-агониста 12E10 важно, чтобы антигенсвязывающий центр был бивалентным (димер). Принимая во внимание, что IgG 12E10 не продемонстрировал никакой активности, можно предположить, что и другие факторы, помимо бивалентности, имеют значения, например, такие как расположение антигенсвязывающего центра, удаленность или угол.

#### Промышленное применение

Модифицированные антитела изобретения обладают агонистической активностью - способностью трансдуцировать сигнал в клетки путем образования поперечных сшивок молекул (молекулы) поверхности клетки и обладает тем преимуществом, что их способность проникновения в ткани и опухоли за счет уменьшенных в сравнении с молекулой антитела (целый IgG) молекулярных размеров высока. Данное изобретение обеспечивает модифицированные антитела со значительно более высокой агонистической активностью, чем у TPO или исходных антител (целый IgG). В частности, даже не обладающие агонистической активностью исходные антитела могут быть преобразованы в модифицированные антитела с агонистической активностью более высокой, чем у TPO. Таким образом, модифицированные антитела могут применяться в качестве агонистов трансдукции сигнала. Модификация молекулы антитела приводит к уменьшению побочных эффектов, вызываемых образованием межклеточных поперечных сшивок, и обеспечивает



новые лекарственные средства, вызывающие только желательные последствия при поперечной сшивке молекулы или молекул клеточной поверхности. Медицинские препараты, содержащие в качестве активного компонента модифицированные антитела изобретения, могут применяться как профилактические и/или лекарственные средства при

5 заболеваний крови, связанных с тромбоцитами, при тромбоцитопении, вызванной химиотерапией при лечении разных видов рака или лейкемии и т.п.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 5 <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA  
<120> Небольшое, ремоделирующее агонистическое антитело к TPO  
<130> FP1033
- 10 <141> 2001-10-22  
<150> JP2000-321821  
<151> 2000-10-20
- 15 <150> PCT/JP01/03288  
<151> 2001-04-17  
<150> JP2001-277314
- 20 <151> 2001-09-12
- 25 <160> 113
- <210> 1
- 30 <211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность
- 35 <220>  
<223> ПЦР-праймер  
<400> 1
- 40 ccacccaat acgactcact atagggc 27
- <210> 2
- 45 <211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность
- 50

<220>

<223> ПЦР-праймер

5 <400> 2

ggatccccggg tggatggtgg gaagatg 27

10 <210> 3

<211> 28

<212> ДНК

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

20 <400> 3

ggatccccggg ccagtggata gacagatg 28

25 <210> 4

<211> 26

<212> ДНК

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> ПЦР-праймер

<400> 4

ggatccccggg agtggataga ccgatg 26

40 <210> 5

<211> 394

45 <212> ДНК

<213> МЫШЬ

<220>

50

<221> CDS

<222> (1)... (393)

5 <223> pGEM-M1L. 1-57; сигнальный пептид, 58-394; зрелый пептид

<400> 5

```

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gcg 48
10 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
    1             5             10             15
tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
15 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
           20             25             30
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 144
20 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
           35             40             45
cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag cca 192
25 Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
           50             55             60
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
30 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
           65             70             75             80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
35 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
           85             90             95
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336
40 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
           100            105            110
tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg 384
45 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu
           115            120            125

```

50

gaa ata aaa c

Glu Ile Lys

5 130

<210> 6

10 <211> 409

<212> ДНК

<213> МЫШЬ

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

20 <223> pGEM-M1H. 1-57; сигнальный пептид, 58-409; зрелый пептид

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

25 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gta aag 96

30 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys

20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

35 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192

40 Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tac aat 240

45 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

50

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser  
 5                   85                   90                   95  
 gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336  
 Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 10                   100                   105                   110  
 tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln  
 15                   115                   120                   125  
 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g 409  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 20                   130                   135

<210> 7

25 <211> 394

<212> ДНК

30 <213> Мышь

<220>

<221> CDS

35 <222> (1)... (393)

<223> pGEM-M2L. 1-57; сигнальный пептид, 58-394; зрелый пептид

<400> 7

40 atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt 48  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Gly  
   1                   5                   10                   15  
 45 tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc 96  
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
                   20                   25                   30

50



&lt;222&gt; (1)... (408)

&lt;223&gt; pGEM-M2H. 1-57; сигнальный пептид, 58-409; зрелый пептид

5 &lt;400&gt; 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

10 1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag 96

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

15 20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20 35 40 45

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

25 50 55 60

gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

30 65 70 75 80

gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc 288

Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr

35 85 90 95

aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336

Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val

40 100 105 110

tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln

45 115 120 125

ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g 409

50



Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130

135

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 32

10

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

15

&lt;223&gt; ПЦР-праймер

&lt;400&gt; 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

20

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 32

25

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

30

&lt;223&gt; ПЦР-праймер

&lt;400&gt; 10

35

cccaagcttc caccatggaaggaggctgga ta 32

&lt;210&gt; 11

40

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

45

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ПЦР-праймер

&lt;400&gt; 11

50

cgcggatcca ctcacgtttt atttccagct tggt 34

5 <210> 12

<211> 34

<212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

15 <400> 12

cgcggatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

20 <210> 13

<211> 30

<212> ДНК

25 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

30 <400> 13

catgcatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

35 <210> 14

<211> 27

40 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

45 <223> ПЦР-праймер

<400> 14

accaccact gaggagactg tgagagt 27

50

<210> 15

<211> 27

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> ПЦР-праймер

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

15

<210> 16

<211> 27

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> ПЦР-праймер

<400> 16

30 сасааатсс gatccgccac сасссга 27

30

<210> 17

35 <211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 17

45 ggcggatcgg atgttgatgat gaccсаа 27

50

<210> 18

<211> 57

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> ПЦР-праймер

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc tttgtagtct tttatttcca gcttggt 57

15

<210> 19

<211> 45

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> Аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность

линкера

<400> 19

30

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35

5

10

15

<210> 20

40 <211> 828

<212> ДНК

<213> Мышь

45

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

50

<223> pscM1. MABL1-scFv

<400> 20

5 atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc gct 48  
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

10 gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac 96  
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp  
20 25 30

15 ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 144  
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
35 40 45

20 tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg 192  
Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly  
50 55 60

25 cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act 240  
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr  
65 70 75 80

30 aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa 288  
Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys  
85 90 95

35 tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 336  
Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp  
100 105 110

40 tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac 384  
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp  
115 120 125

45 tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg 432  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
50

	130		135		140															
	ggt	ggt	ggt	ggt	tcg	ggt	ggt	ggc	gga	tcg	gat	gtt	gtg	atg	acc	caa	480			
5	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln				
	145		150		155		160													
	act	cca	ctc	tcc	ctg	cct	gtc	agt	ctt	gga	gat	caa	gcc	tcc	atc	tct	528			
10	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser				
			165		170		175													
	tgc	aga	tct	agt	cag	agc	ctt	cta	cac	agt	aaa	gga	aac	acc	tat	tta	576			
15	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Lys	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu				
			180		185		190													
	caa	tgg	tac	cta	cag	aag	cca	ggc	cag	tct	cca	aag	ctc	ctg	atc	tac	624			
20	Gln	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr				
			195		200		205													
	aaa	gtt	tcc	aac	cga	ttt	tct	ggg	gtc	cca	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	672			
25	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser				
			210		215		220													
	gga	tca	ggg	aca	gat	ttc	aca	ctc	aag	atc	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	720			
30	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu				
	225		230		235		240													
	gat	ctg	gga	gtt	tat	ttc	tgc	tct	caa	agt	aca	cat	gtt	ccg	tac	acg	768			
35	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Tyr	Thr				
			245		250		255													
	tcc	gga	ggg	ggg	acc	aag	ctg	gaa	ata	aaa	gac	tac	aaa	gac	gat	gac	816			
40	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp				
			260		265		270													
45	gat	aaa	taatga																828	
	Asp	Lys																		

50

<210> 21

<211> 31

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> ПЦР-праймер

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

15

<210> 22

<211> 18

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> ПЦР-праймер

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

30

<210> 23

35 <211> 819

<212> ДНК

<213> Мышь

40 <220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

45 <223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48

50

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15  
5 gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gta aag 96  
Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys  
20 25 30  
10 cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45  
15 gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192  
Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60  
20 gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tac aat 240  
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
65 70 75 80  
25 gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc 288  
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser  
85 90 95  
30 gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336  
Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110  
35 tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln  
115 120 125  
40 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt 432  
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
130 135 140  
45 ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc 480  
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu  
50





<220>

<221> CDS

5 <222> (1)... (822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

10 atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc gct 48

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

15 gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa 96

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu

20 25 30

20 ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 144

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

25 tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg 192

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly

50 55 60

30 cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act 240

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr

65 70 75 80

35 aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 288

Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

85 90 95

40 tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 336

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp

100 105 110

45 tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac 384

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp

50

	115	120	125	
	tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg			432
5	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	130	135	140	
	ggg ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa			480
10	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln			
	145	150	155	160
	agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct			528
15	Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser			
	165	170	175	
	tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta			576
20	Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr			
	180	185	190	
	cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac			624
25	His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
	195	200	205	
	aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt			672
30	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser			
	210	215	220	
	gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag			720
35	Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			
	225	230	235	240
	gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg			768
40	Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr			
	245	250	255	
	ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac			816
45	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp			
	260	265	270	
50				

gat aaa taatga

828

Asp Lys

5

<210> 25

<211> 819

10

<212> ДНК

<213> МЫШЬ

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

20

<400> 25

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

25

1 5 10 15

gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag 96

Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

30

20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

35 40 45

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

40

50 55 60

gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

45

65 70 75 80

gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc 288

50

Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr  
 85 90 95

5 aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

10 tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln  
 115 120 125

15 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt 432  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

20 ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc 480  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu  
 145 150 155 160

25 tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca 528  
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser  
 165 170 175

30 agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 576  
 Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr  
 180 185 190

35 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc 624  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser  
 195 200 205

40 aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg 672  
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val  
 210 215 220

45 aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720  
 Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly  
 50



Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp  
 50 55 60  
 5 att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc act gtc ccc act gac 240  
 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp  
 65 70 75 80  
 10 ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa tta cta aaa gga gat gcc 288  
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala  
 85 90 95  
 15 tct ttg aag atg gat aag agt gat gct gtc tca cac aca gga aac tac 336  
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr  
 100 105 110  
 20 act tgt gaa gta aca gaa tta acc aga gaa ggt gaa acg atc atc gag 384  
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu  
 115 120 125  
 25 cta aaa tat cgt gtt gtt tca tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac 432  
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr  
 130 135 140  
 30 aag gac gac gat gac aag tgatag 456  
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 35 145 150

<210> 27

40 <211> 46

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

45 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 27

50

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

- 5 <210> 28
- <211> 31
- <212> ДНК
- 10 <213> Искусственная последовательность

- <220>
- <223> ПЦР-праймер

- 15 <400> 28
- ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31

- 20 <210> 29
- <211> 741
- <212> ДНК
- 25 <213> МЫШЬ

- <220>
- <221> CDS
- 30 <222> (1)... (735)
- <223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

- 35 <400> 29
- atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 48
- Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

- 40 1 5 10 15
- gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac 96
- Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn

- 45 20 25 30
- cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg 144
- His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

50



	35	40	45	
	att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag			192
5	Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys			
	50	55	60	
	ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc			240
10	Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala			
	65	70	75	80
	tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac			288
15	Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr			
	85	90	95	
	tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc			336
20	Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110	
	act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg			384
25	Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	115	120	125	
	ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg			432
30	Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu			
	130	135	140	
	cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag			480
35	Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln			
	145	150	155	160
	agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag			528
40	Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln			
	165	170	175	
	aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga			576
45	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg			
	180	185	190	
50				

ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat 624  
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp  
 5           195                   200                   205  
 ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat 672  
 Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr  
 10         210                   215                   220  
 ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720  
 Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 15         225                   230                   235                   240  
 aag ctg gaa ata aaa taatga                                   741  
 Lys Leu Glu Ile Lys  
 20                                 245

25 <210> 30  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер  
 35 <400> 30  
 cagacagtgg ttcaaagt 18  
 40 <210> 31  
 <211> 72  
 <212> ДНК  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер  
 50

<400> 31

cgcgctcgacc gatccgccac caccegaacc accaccacc gaaccaccac caccttttat 60  
 5 ttccagcttg gt 72

<210> 32

10 <211> 1605

<212> ДНК

<213> **МЫШЬ**

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)... (1599)

20 <223> pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2

<400> 32

25 atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

30 gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag 96  
 Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20 25 30

35 cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

40 gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192  
 Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

45 gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat 240  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

50

gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc 288  
 Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr  
 5                           85                           90                           95  
 aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 10                           100                           105                           110  
 tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln  
 15                           115                           120                           125  
 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt 432  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 20                           130                           135                           140  
 ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc 480  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu  
 25                           145                           150                           155                           160  
 tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca 528  
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser  
 30                           165                           170                           175  
 agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 576  
 Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr  
 35                           180                           185                           190  
 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc 624  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser  
 40                           195                           200                           205  
 aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg 672  
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val  
 45                           210                           215                           220  
 aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720  
 50

Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly  
 225 230 235 240  
 5 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg 768  
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly  
 245 250 255  
 10 ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt 816  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 260 265 270  
 15 tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct 864  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser  
 275 280 285  
 20 gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 912  
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys  
 290 295 300  
 25 gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 960  
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln  
 305 310 315 320  
 30 aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat 1008  
 Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn  
 325 330 335  
 35 gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 1056  
 Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr  
 340 345 350  
 40 tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc 1104  
 Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala  
 355 360 365  
 45 tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act 1152  
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr  
 50



gac gat gac gat aaa taatga

Asp Asp Asp Asp Lys

5 530

<210> 33

10 <211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 33

20 tgaggaattc ccaccatggg atg 33

<210> 34

25 <211> 40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

30 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 34

35 caccagctca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

40 <210> 35

<211> 40

<212> ДНК

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

50

<400> 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

5

<210> 36

<211> 31

10 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

15 <223> ПЦР-праймер

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

20

<210> 37

<211> 22

25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

30

<223> ПЦР-праймер

<400> 37

35 cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

40 <211> 46

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

45

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 38

50



gcaattggac ctgttttatc tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

5 <210> 39

<211> 45

<212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

15 <400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

20 <210> 40

<211> 60

<212> ДНК

25 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

30

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttgtagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

35

<210> 41

<211> 32

40 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

45 <223> ПЦР-праймер

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctggt ag 32

50

<210> 42

<211> 40

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> ПЦР-праймер

<400> 42

cagtctcgag tggtaggtcc gacgtcgtga tgacccaag 40

15

<210> 43

<211> 43

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> ПЦР-праймер

<400> 43

cagtctcgag tggtaggtgt tccgacgtcg tgatgacca aag 43

30

<210> 44

35 <211> 46

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

40

<223> ПЦР-праймер

<400> 44

45 cagtctcgag tggtaggtgt ggttccgacg tcgtgatgac ccaag 46

50

<210> 45

<211> 49

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> ПЦР-праймер

<400> 45

cagtctcgag tggtagtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaag 49

15

<210> 46

<211> 52

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> ПЦР-праймер

<400> 46

30 cagtctcgag tggtagtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgaccca ag 52

<210> 47

35 <211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 47

45 ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

50





<210> 49

<211> 45

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> ПЦР-праймер

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

15

<210> 50

<211> 48

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> ПЦР-праймер

<400> 50

30 caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

35 <211> 51

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 51

45 caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

50

<211> 54

<212> ДНК

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

10 <400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

15 <210> 53

<211> 57

<212> ДНК

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

25 <400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tgggtggccag gtccaattgc agcagtc 57

30

<210> 54

<211> 780

35 <212> ДНК

<213> МЫШЬ

<220>

40 <221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

45 <400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

50





aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561  
 Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp  
 5                           175                           180                           185  
 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612  
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp  
 10                   190                           195                           200  
 aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663  
 Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp  
 15   205                           210                           215                           220  
 tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp  
 20                           225                           230                           235  
 ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765  
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp  
 25           240                           245                           250                           255  
 aaa taa tga gga tcc 780  
 Lys  
 30  
 <210> 55  
 <211> 351  
 35 <212> ДНК  
 <213> Человек  
 <220>  
 40 <221> CDS  
 <222> (1)... (351)  
 45 <223> 12B5HV. 1-351 пептид  
 <400> 55  
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 48  
 50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 5 tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac 96  
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr  
 20 25 30  
 10 ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 15 gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat gca gac tcc gtg 192  
 Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 20 cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acc ctg tat 240  
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 25 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 30 gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg 336  
 Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 35 100 105 110  
 gtc acc gtc tcg agt 351  
 Val Thr Val Ser Ser  
 40 115

<210> 56

45 <211> 57

<212> ДНК

<213> Человек

50

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)... (57)

<223> **Лидерная последовательность**

<400> 56

10 atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

5

10

15

15 gtc cag tgt

57

Val Gln Cys

20

<210> 57

<211> 115

25

<212> ДНК

<213> **Искусственная последовательность**

<220>

30

<223> 12B5VH-1

<400> 57

35 atggagtttg ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggettg gtccggcccc gggggtcctt gagtc 115

40 <210> 58

<211> 115

<212> ДНК

45 <213> **Искусственная последовательность**

<220>

<223> 12B5VH-2

50

<400> 58

aaggatatac ctgccacca ctccagcccc ttgcctggag cctggcggac ccagtgcattg 60

5 ccgtaggtcc tgagggtgat tccagagact gcacaggaga gactcaggga ccccc 115

<210> 59

10 <211> 115

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> 12B5VH-3

<400> 59

20 ggcagggtata tcctttgacg gaagaagtga atactatgca gactccgtgc agggccgatt 60

caccatctcc agagacagtt ccaagaacac cctgtatctg caaatgaaca gcctg 115

25

<210> 60

<211> 108

<212> ДНК

30

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> 12B5VH-4

<400> 60

actcgagacg gtgaccattg tccttggcc ccagatatcg aaaccataat gtgctcctct 60

40 cgcacagtaa tacacagccg tgcctcteggc tctcaggctg ttcatttg 108

<210> 61

45

<211> 32

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> 12B5VH-S, ПЦР-праймер

5 <400> 61

ttcaagcttc caccatggag tttgggctga gc 32

10 <210> 62

<211> 34

<212> ДНК

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 12B5VH-A, ПЦР-праймер

20 <400> 62

ttgggatcca ctcaccactc gagacggatga ccat 34

25 <210> 63

<211> 588

<212> ДНК

30 <213> Человек

<220>

35 <221> CDS

<222> (236)... (558)

<223> 1-235;интрон, 236-558; Константная область (часть) IgG человека

40 <400> 63

gaattcgtga gtggatccca agctagcttt ctggggcagg ccaggcctga ccttggcttt 60

ggggcagggga gggggctaag gtgaggcagg tggcgccagc caggtgcaca cccaatgccc 120

45 atgagcccag acaactggacg ctgaacctcg cggacagtta agaaccagc ggcctctgcg 180

ccctgggccc agctctgtcc cacaccgagg tcacatggca caacctctct tgca gcc 237

Ala

50

tcc acc aag ggc cca tgc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc 285  
 5 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
                   5                  10                  15  
 acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc 333  
 10 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
                   20                  25                  30  
 ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc 381  
 15 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
                   35                  40                  45  
 gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc 429  
 20 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
                   50                  55                  60                  65  
 agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac 477  
 25 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
                   70                  75                  80  
 atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa 525  
 30 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
                   85                  90                  95  
 gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca 558  
 35 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
                   100                  105  
 40

<210> 64

<211> 27

45 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

50

<223> G1CH1-S, ПЦР-праймер

<400> 64

5 tgagaattcg tgagtggatc ccaagct 27

<210> 65

10 <211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> G1CH1-A, ПЦР-праймер

<400> 65

20 aaaagatcctt tatcatgtgt gagttttgtc acaagatttg ggc tcaactt tcttgtccac 60

<210> 66

25 <211> 432

<212> ДНК

<213> Человек

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (12)... (419)

<223> HEF-12B5H-g гамма. 12-419 пептид

<400> 66

40 aagcttccac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt 50

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu

1

5

10

45 tta aga ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc 98

Leu Arg Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly

15

20

25

50

5    ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga 146  
 Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly  
     30                      35                      40                      45  
 atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc 194  
 Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 10                      50                      55                      60  
 aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa 242  
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu  
 15                      65                      70                      75  
 tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt 290  
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser  
 20                      80                      85                      90  
 tcc aag aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac 338  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 25                      95                      100                      105  
 acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc 386  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile  
 30    110                      115                      120                      125  
 tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt ggtgagtgga tcc 432  
 35    Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
                             130                      135

40 <210> 67  
     <211> 321  
     <212> ДНК  
 45 <213> Человек  
     <220>  
     <221> CDS

50



<222> (1)... (321)

<223> 12B5LV. 1-321 пептид

5 <400> 67

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly

10 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp

15 20 25 30

ttg gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

20 35 40 45

tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc gcc 192

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly

25 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

30 65 70 75 80

gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc 288

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu

35 85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa 321

40 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

45 <210> 68

<211> 66

<212> ДНК

50



<223> 12B5VL-2

<400> 70

5 ggagtttagg ggctttccct ggcttctgct gataccaggc caaccagtga taaataccct 60  
cgctggcccc gcaggtgatg gtgactctgt ctccaataga tgacagacagg 110

10 <210> 71

<211> 110

<212> ДНК

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 12B5VL-3

20 <400> 71

aagcccctaa actcctgatc tataaggcct ctagtttagc cagtggggcc ccatcaaggt 60  
tcagcggcag tggatctggg acagattca ctctcaccat cagcagcctg 110

25

<210> 72

<211> 103

30

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35

<223> 12B5VL-4

<400> 72

40 tttgatctcc agcttgggtcc ctccgccgaa agtgagcgga taattactat attggtggca 60  
gtaataagtt gcaaaatcat caggctgcag gctgctgatg gtg 103

45 <210> 73

<211> 32

<212> ДНК

50

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <223> 12B5VL-S, ПЦР-праймер

<400> 73

ttcaagcttc caccatggac atgagggtcc cc 32

10

<210> 74

<211> 35

15 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

20 <223> 12B5VL-A, ПЦР-праймер

<400> 74

tctaggatcc actcacgttt gatctccagc ttggt 35

25

<210> 75

<211> 415

30

<212> ДНК

<213> Человек

<220>

35

<221> CDS

<222> (12)... (398)

40 <223> HEF-12B5H-g каппа. 12-398 пептид

<400> 75

aagcttccac c atg gac atg agg gtc ccc gct cag etc ctg ggg etc ctg 50

45

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu

1

5

10

ctg etc tgg etc cca ggt gcc aaa tgt gac atc cag atg acc cag tct 98

50

Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser  
 15 20 25  
 5 cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc 146  
 Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 30 35 40 45  
 10 cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag 194  
 Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 50 55 60  
 15 cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc 242  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala  
 65 70 75  
 20 agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc 290  
 Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 80 85 90  
 25 act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac 338  
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr  
 95 100 105  
 30 tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag 386  
 Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 110 115 120 125  
 35 ctg gag atc aaa cgtgagtgga tcctaga 415  
 Leu Glu Ile Lys  
 40  
 <210> 76  
 <211> 24  
 45 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 50

<223> Последовательность метки FLAG

<400> 76

5 gac tac aag gat gac gac gat aag 24  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

5

10

<210> 77

<211> 31

15 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

20 <223> 12B5-S, ПЦР-праймер

<400> 77

25 atagaattcc accatggagt ttgggctgag c 31

<210> 78

<211> 24

30

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35

<223> HuVHJ3, ПЦР-праймер

<400> 78

40 tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 79

45

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> RhuJH3, ПЦР-праймер

5 <400> 79

ggacaatggg caccgtctct tcaggtgg 28

10 <210> 80

<211> 32

<212> ДНК

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> RhuVK1, ПЦР-праймер

20 <400> 80

ggagactggg tcactctggat gtccgatccg cc 32

25 <210> 81

<211> 23

<212> ДНК

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HuVK1.2, ПЦР-праймер

35 <400> 81

gacatccaga tgaccagtc tcc 23

40 <210> 82

<211> 59

45 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

50





tta aga ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc 98  
 Leu Arg Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly  
 5           15                           20                           25  
 ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga 146  
 Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly  
 10       30                           35                           40                           45  
 atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc 194  
 Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 15                           50                           55                           60  
 aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa 242  
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu  
 20                           65                           70                           75  
 tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt 290  
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser  
 25                           80                           85                           90  
 tcc aag aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac 338  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 30                           95                           100                           105  
 acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc 386  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile  
 35       110                           115                           120                           125  
 tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcg 434  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 40                           130                           135                           140  
 ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag 482  
 45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln  
                           145                           150                           155  
 tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc 530  
 50

Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
 160 165 170

5 tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag 578  
 Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 175 180 185

10 aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta 626  
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu  
 190 195 200 205

15 gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat 674  
 Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 210 215 220

20 ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat 722  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr  
 225 230 235

25 TAC TGC CAA CAA TAT AGT AAT TAT CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC 770  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 240 245 250

30 aag ctg gag atc aaa gac tac aag gat gac gac gat aag tgataagcgg c 820  
 Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 255 260 265

35 cgc 823

40 <210> 85

<211> 114

<212> Белок

45 <213> Человек

<400> 85

50

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

<210> 86

<211> 342

<212> ДНК

<213> Человек

<400> 86

40 caggtgcagc tgcagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
 acctgcactg tctctggtga ctccatcagt agttactact ggagctggat tcggcagccc 120  
 ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180  
 45 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg 240  
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgagag agggcggtac 300  
 ttcgatgtct ggggcccgtgg caccatggtc actgtctcct ca 342

50

<210> 87

<211> 57

5 <212> ДНК

<213> Человек

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> Лидерная последовательность

15 <308> GenBank No. AF062252

<400> 87

atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48

20 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

gtc ctg tcc 57

25 Val Leu Ser

<210> 88

30 <211> 110

<212> ДНК

35 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 12E10VH1

40 <400> 88

atgaaacatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60

gtgcagctgc agcagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct 110

45 <210> 89

50

<211> 110

<212> ДНК

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 12E10VH2

10 <400> 89

acccaatcca ctccagtccc ttccctgggg gctgccgaat ccagctccag tagtaactac 60

tgatggagtc accagagaca gtgcaggtga gggacagggt ctccgaagc 110

15

<210> 90

<211> 110

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> 12E10VH3

<400> 90

30 tggagtggat tgggtatata tattacagtg ggagcaccaa ctacaacccc tcctcaaga 60

gtcagatcac catatcagta gacacgtcca agagccagtt ctccctgaag 110

35

<210> 91

<211> 114

<212> ДНК

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 12E10VH4

45

<400> 91

tgaggagaca gtgaccatgg tgccacggcc ccagacatcg aagtaccgcc ctctgcaca 60

gtaatacacg gccgtgtctg cggcggtcac agagctcagc ttcagggaga actg 114

50

<210> 92

<211> 32

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <223> 12E10VHS, ПЦР-праймер

<400> 92

ttcaagcttc caccatgaaa catctgtggt tc 32

15

<210> 93

<211> 34

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25

<223> 12E10VHA, ПЦР-праймер

<400> 93

ttgggatcca ctcacctgag gagacagtga ccat 34

30

<210> 94

<211> 426

35

<212> ДНК

<213> Мышь

<220>

40

<221> CDS

<222> (12)... (417)

45

<223> 12E10H, V-область H-цепи

<400> 94

50

aagcttccac c atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 50  
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala  
 1 5 10  
 5 ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga 98  
 Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly  
 10 15 20 25  
 ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt 146  
 Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly  
 15 30 35 40 45  
 gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg 194  
 Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly  
 20 50 55 60  
 aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac 242  
 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn  
 25 65 70 75  
 tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc 290  
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser  
 30 80 85 90  
 aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg 338  
 Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr  
 35 95 100 105  
 gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt 386  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg  
 40 110 115 120 125  
 ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggtgagtgga tcccaa 426  
 45 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 130

50

<210> 95

<211> 110

5 <212> **Белок**

<213> **МЫШЬ**

10 <400> 95

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

15 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

20 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

25 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg

30 85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

35 100 105 110

<210> 96

40 <211> 330

<212> **ДНК**

<213> **МЫШЬ**

45

<400> 96

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

50



tctgcaactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120  
 caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggca gtaaacggcc ctcaggggtt 180  
 5 tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caaccagaag cactcgggtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

10

<210> 97

<211> 57

15

<212> ДНК

<213> Человек

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> Лидерная последовательность

25

<310>

<400> 97

30

atg gcc tgg acc gtt ctc ctc ctc ggc ctc ctc tct cac tgc aca ggc 48

Met Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ser His Cys Thr Gly

1

5

10

15

35

tct gtg acc

57

Ser Val Thr

40

<210> 98

<211> 110

<212> ДНК

45

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 12E10VL1, ПЦР-праймер

50

<400> 98

atggcctgga ccgttctcct cctcggcctc ctctctcact gcacaggctc tgtgacctcc 60

5 tatgtgctga ctcagccacc ctcgggtgca gggctctcctg gacagtcgat 110

<210> 99

10 <211> 62

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> 12E10VL2, ПЦР-праймер

<400> 99

20 tcatgagttt gggggctttg cctgggtgct gttggtacca ggagacatag ttataaccac 60

caacgtcact gctggttcca gtgcaggaga tggatgatcga ctgtccagga 110

25 <210> 100

<211> 110

<212> ДНК

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> 12E10VL3, ПЦР-праймер

<400> 100

ccccaaact catgatttat gagggcagta aacggcctc aggggtttct aatcgcttct 60

40 ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccag 110

<210> 101

45 <211> 102

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> 12E10VL4, ПЦР-праймер

5 <400> 101

taggacggtc agcttgggtcc ctccgccgaa cacccgagtg cttctggttg tatatgagct 60

gcagtaataa tcagcctcgt cctcagcctg gagcccagag at 102

10

<210> 102

<211> 31

15 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

20 <223> 12E10VLS, ПЦР-праймер

<400> 102

atcaagcttc caccatggcc tggaccgttc t 31

25

<210> 103

<211> 36

30

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35

<223> 12E10VLA, ПЦР-праймер

<400> 103

40 ctaggatccg ggctgacctt ggacgggtcag cttggt 36

<210> 104

45 <211> 387

<212> ДНК

<213> МЫШЬ

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1)... (387)

&lt;223&gt; 12E10L, V-область L-цепи

&lt;310&gt;

10 &lt;400&gt; 104

atg gcc tgg acc gtt ctc ctc ctc ggc ctc ctc tct cac tgc aca ggc 48

Met Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ser His Cys Thr Gly

15 1 5 10 15

tct gtg acc tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca ggg tct 96

Ser Val Thr Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser

20 20 25 30

cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt 144

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val

25 35 40 45

ggg ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc 192

Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala

30 50 55 60

ccc aaa ctc atg att tat gag ggc agt aaa cgg ccc tca ggg gtt tct 240

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser

35 65 70 75 80

aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc 288

40 Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile

85 90 95

tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat 336

45 Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr

100 105 110

Aca acc aga agc act cgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc 384

50

Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

115

120

125

5 cta 387

Leu

10 <210> 105

<211> 24

<212> ДНК

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)... (24)

<223> Лидерная последовательностьFLAG

<400> 105

25 gac tac aag gat gac gac gat aag 24

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

30 <210> 106

<211> 30

<212> ДНК

35 <213> Искусственная последовательность

<220>

40 <223> 12E10S, ПЦР-праймер

<400> 106

tatgaattcc accatgaaac atctgtggtt 30

45 <210> 107

<211> 38

50

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

5 <220>

<223> DB2, ПЦР-праймер

<400> 107

10 taggagctac cgctccacc tgaggagaca gtgacat 38

<210> 108

15 <211> 44

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<223> DB1, ПЦР-праймер

<400> 108

25 gtctcctcag gtggagcggt tagctctat gtgctgactc agcc 44

<210> 109

30 <211> 59

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

35 <220>

<223> 12E10FA, ПЦР-праймер

40 <400> 109

attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tcctttagt ctaggacggt cagcttggt 59

45 <210> 110

<211> 792

<212> ДНК

50

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <221> CDS

<222> (11)... (778)

<223> 12E10, одноцепочный Fv

10 <400> 110

gaattccacc atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 49

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala

15                    1                    5                    10

ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga 97

Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly

20                    15                    20                    25

ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt 145

Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

25                    30                    35                    40                    45

gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg 193

Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly

30                    50                    55                    60

aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac 241

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn

35                    65                    70                    75

tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc 289

40 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser

80                    85                    90

aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg 337

45 Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

95                    100                    105

gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt 385

50

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg  
 110 115 120 125

5 ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggt gga ggc ggt agc tcc tat gtg 433  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val  
 130 135 140

10 ctg act cag cca ccc tgc gtg tca ggg tct cct gga cag tgc atc acc 481  
 Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr  
 145 150 155

15 atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc 529  
 Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val  
 160 165 170

20 tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat 577  
 Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr  
 175 180 185

25 gag ggc agt aaa cgg ccc tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc 625  
 Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser  
 190 195 200 205

30 aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag 673  
 Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu  
 210 215 220

35 gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat aca acc aga agc act cgg 721  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg  
 225 230 235

40 gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta gac tac aag gat gac 769  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys Asp Asp  
 240 245 250

45 gac gat aag tgataagcgg ccgc 792  
 Asp Asp Lys

50



5 <210> 111  
 <211> 62  
 <212> ДНК  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> sc4. 3, ПЦР-праймер  
 15 <400> 111  
 ggtggctgag tcagcacata ggacgatccg ccaccaccgg aaccaccacc acccgaacca 60  
 cc 62  
 20  
 <210> 112  
 <211> 61  
 25 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 30 <223> sc1. 3, ПЦР-праймер  
 <400> 112  
 35 gcaccatggt cactgtctcc tcaggtggtg gtggttcggg tgggtggtggt tcgggtggtg 60  
 g 61  
 40 <210> 113  
 <211> 822  
 <212> ДНК  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> CDS  
 50

<222> (11)... (807)

<223> sc12E10, одноцепочный Fv

5 <400> 113

gaattccacc atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 49

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala

10 1 5 10

ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga 97

Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly

15 15 20 25

ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt 145

Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20 30 35 40 45

gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg 193

Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly

25 50 55 60

aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac 241

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn

30 65 70 75

tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc 289

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser

35 80 85 90

aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg 337

40 Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

95 100 105

gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt 385

45 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg

110 115 120 125

ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt 433

50

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

5 ggt tog ggt ggt ggc gga tgc tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg 481  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser  
 145 150 155

10 gtg tca ggg tct cct gga cag tgc atc acc atc tcc tgc act gga acc 529  
 Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr  
 160 165 170

15 agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac 577  
 Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His  
 175 180 185

20 cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gag ggc agt aaa cgg ccc 625  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro  
 190 195 200 205

25 tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc 673  
 Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala  
 210 215 220

30 tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac 721  
 Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 225 230 235

35 tgc agc tca tat aca acc aga agc act cgg gtg ttc ggc gga ggg acc 769  
 Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 240 245 250

40 aag ctg acc gtc cta gac tac aag gat gac gac gat aag tgataagcgg 818  
 Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 255 260 265

45 ccgc 822

Формула изобретения

50 1. Модифицированное антитело - агонист ТРО, способное специфически распознавать и поперечно сшивать рецептор ТРО, содержащее две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела, соединенные напрямую или через линкер ковалентной связью или нековалентной связью, и имеющее меньший размер, чем исходное(ые)

антитело(а) к рецептору ТРО, обладающее (ие) агонистическим действием или по существу не обладающее (ие) агонистическим действием.

2. Модифицированное антитело по п.1, где линкер является пептидным линкером, содержащим по крайней мере одну аминокислоту.

5 3. Модифицированное антитело по любому из пп.1 и 2, которое является мультимером одноцепочечного Fv, содержащего V-область H-цепи и V-область L-цепи.

4. Модифицированное антитело по п.3, которое является тетрамером, тримером или димером одноцепочечного Fv.

5. Модифицированное антитело по п.4, которое является димером одноцепочечного Fv.

10 6. Модифицированное антитело по любому из пп.3-5, в котором V-область H-цепи и V-область L-цепи, находящиеся в одной и той же цепи, объединены таким образом, чтобы не образовывать антигенсвязывающий центр.

7. Модифицированное антитело по любому из пп.1 и 2, которое является одноцепочечным полипептидом, содержащим две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи.

8. Модифицированное антитело по п.7, которое является одноцепочечным полипептидом, содержащим две V-области H-цепи и две V-области L-цепи.

9. Модифицированное антитело по любому из пп.1-8, которое дополнительно содержит аминокислотную последовательность (последовательности) для очистки пептида.

20 10. Модифицированное антитело по любому из пп.1-9, которое является очищенным.

11. Модифицированное антитело по любому из пп.1-10, в котором V-область H-цепи и/или V-область L-цепи являются V-областью H-цепи и/или V-областью L-цепи, происходящими из антитела человека.

25 12. Модифицированное антитело по любому из пп.1-10, в котором V-область H-цепи и/или V-область L-цепи является гуманизированной V-областью H-цепи и/или гуманизированной V-областью L-цепи.

13. Модифицированное антитело по любому из пп.1-12, которое является моноспецифическим модифицированным антителом.

30 14. Модифицированное антитело по любому из пп.1-12, которое является мультиспецифическим модифицированным антителом.

15. Модифицированное антитело по п.14, которое является биспецифическим модифицированным антителом.

16. Модифицированное антитело по п.13, в котором V-область L-цепи и V-область H-цепи происходит из одного и того же моноклонального антитела.

35 17. Модифицированное антитело по любому из пп.1-16, которое проявляет равное или более сильное агонистическое действие (ED50), сравнительно с исходным моноклональным антителом.

40 18. Модифицированное антитело по п.17, которое проявляет по крайней мере двухкратное превышение агонистического действия (ED50), сравнительно с исходным моноклональным антителом.

19. Модифицированное антитело по п.18, которое проявляет по крайней мере 10-кратное превышение агонистического действия (ED50), сравнительно с исходным моноклональным антителом.

45 20. Модифицированное антитело по любому из пп.1-16, которое происходит из исходного антитела, по существу не обладающего агонистическим действием.

21. Модифицированное антитело по любому из пп.1-20, у которого ED50 ТРО-агонистической активности не превышает 20 пМ.

22. Модифицированное антитело по п.21, у которого ED50 ТРО-агонистической активности не превышает 10 пМ.

50 23. Модифицированное антитело по п.22, у которого ED50 ТРО-агонистической активности не превышает 2 пМ.

24. Модифицированное антитело по любому из пп.1-23, которое обладает межклеточным адгезивным действием (ED50), не превышающим 1/10, сравнительно с

исходным антителом.

25. Модифицированное антитело по любому из пп.1-23, которое по существу практически не обладает межклеточным адгезивным действием.

26. Модифицированное антитело по любому из пп.1-20, проявляющее равное или  
5 большее агонистическое действие (ED50), сравнительно с тромбопоэтином (ТРО).

27. Модифицированное антитело по п.26, которое проявляет по крайней мере двукратное превышение агонистического действия (ED50), сравнительно с ТРО.

28. Модифицированное антитело по п.27, которое проявляет по крайней мере 10-кратное превышение агонистического действия (ED50), сравнительно с ТРО.

10 29. Модифицированное антитело по любому из пп.26-28, у которого ED50 ТРО-агонистической активности не превышает 20 пМ.

30. Модифицированное антитело по п.29, у которого ED50 ТРО-агонистической активности не превышает 10 пМ.

15 31. Модифицированное антитело по п.30, у которого ED50 ТРО-агонистической активности не превышает 2пМ.

32. Модифицированное антитело по любому из пп.26-31, которое обладает межклеточным адгезивным действием (ED50), не превышающим 1/10, сравнительно с исходным антителом.

20 33. Модифицированное антитело по любому из пп.26-31, которое по существу практически не обладает межклеточным адгезивным действием.

34. Способ индукции агонистического действия в клетках, экспрессирующих рецептор ТРО, предусматривающий трансдукцию сигнала ТРО в клетки путем поперечной сшивки рецептора ТРО при контактировании указанных клеток с модифицированным антителом по  
любому из пп.1-33.

25 35. Способ по п.34, в котором агонистическое действие включает пролиферацию, дифференцировку - индукцию или стимуляцию роста мегакариоцитов, образование тромбоцитов или фосфорилирование белка рецептора ТРО.

36. Лекарственное средство для лечения тромбоцитопении, включающее в качестве активного компонента модифицированное антитело по любому из пп.1-33.

30 37. Применение модифицированного антитела по любому из пп.1-33 в качестве лекарственного средства для лечения тромбоцитопении.

38. Способ измерения агонистического действия модифицированного антитела по любому из пп.1-33, который включает следующие этапы:

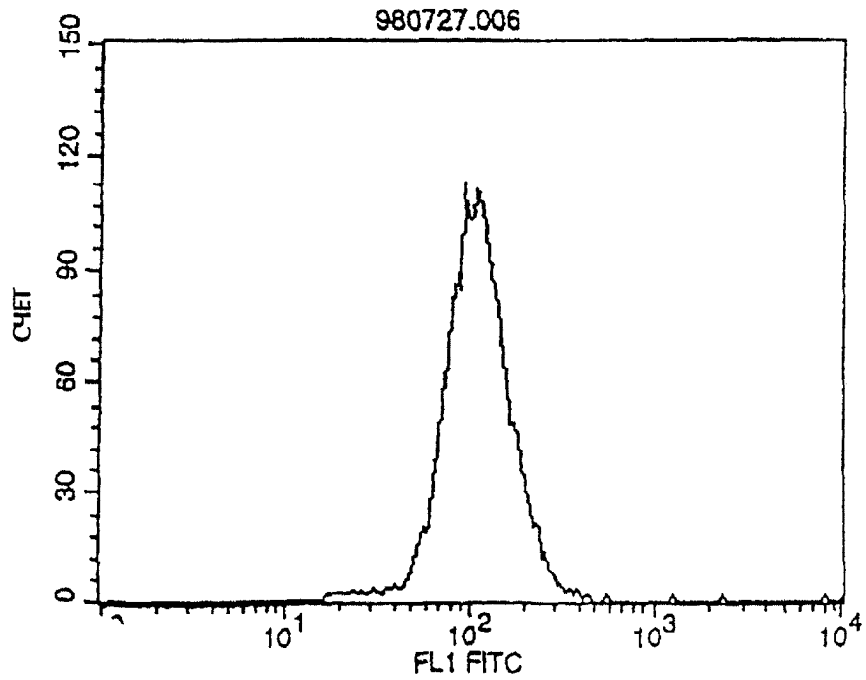
35 (1) получение модифицированного антитела, включающего две или более V-области H-цепи и две или более V-области L-цепи антитела и связывающегося специфически с рецептором ТРО,

(2) осуществление реакции взаимодействия клеток, экспрессирующих указанный рецептор ТРО, с указанным модифицированным антителом и

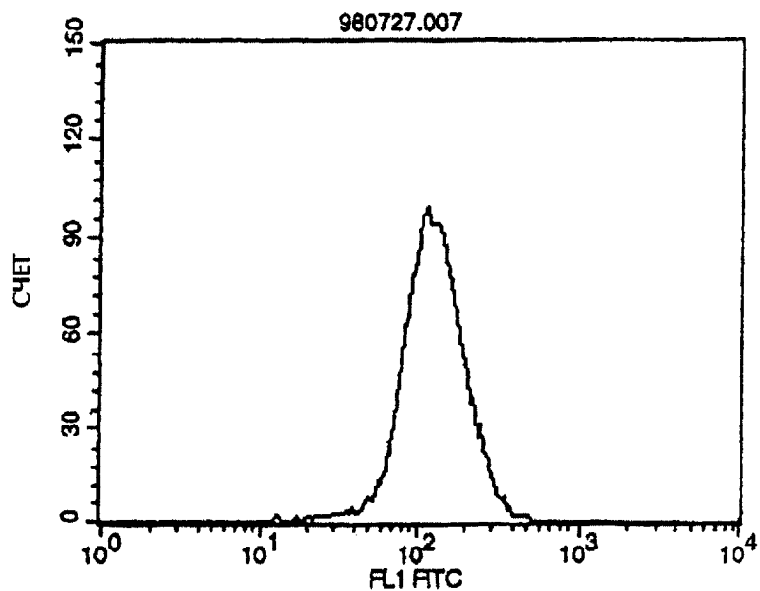
40 (3) измерение ТРО-агонистического действия в клетках, вызванного поперечной сшивкой рецептора ТРО.

45

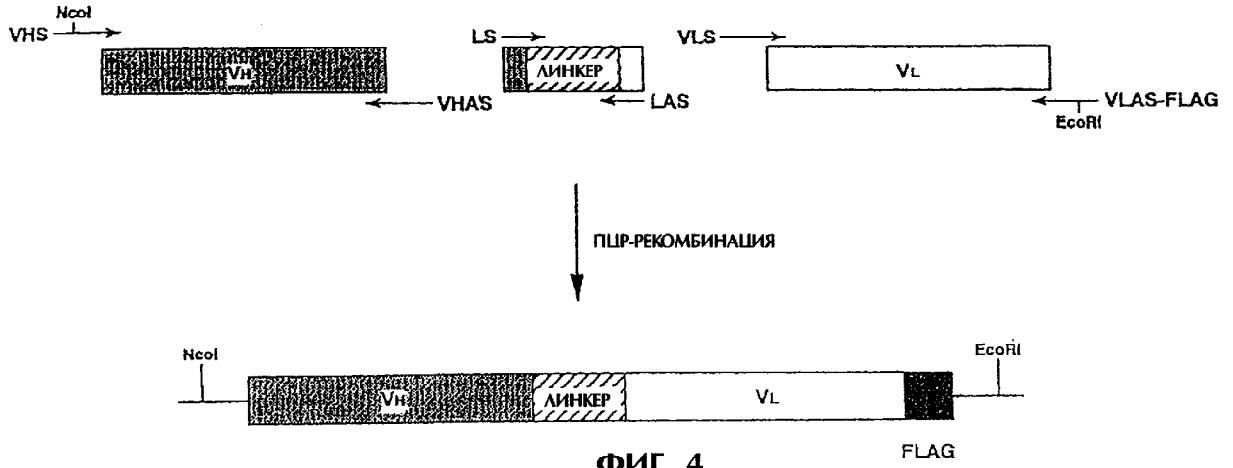
50



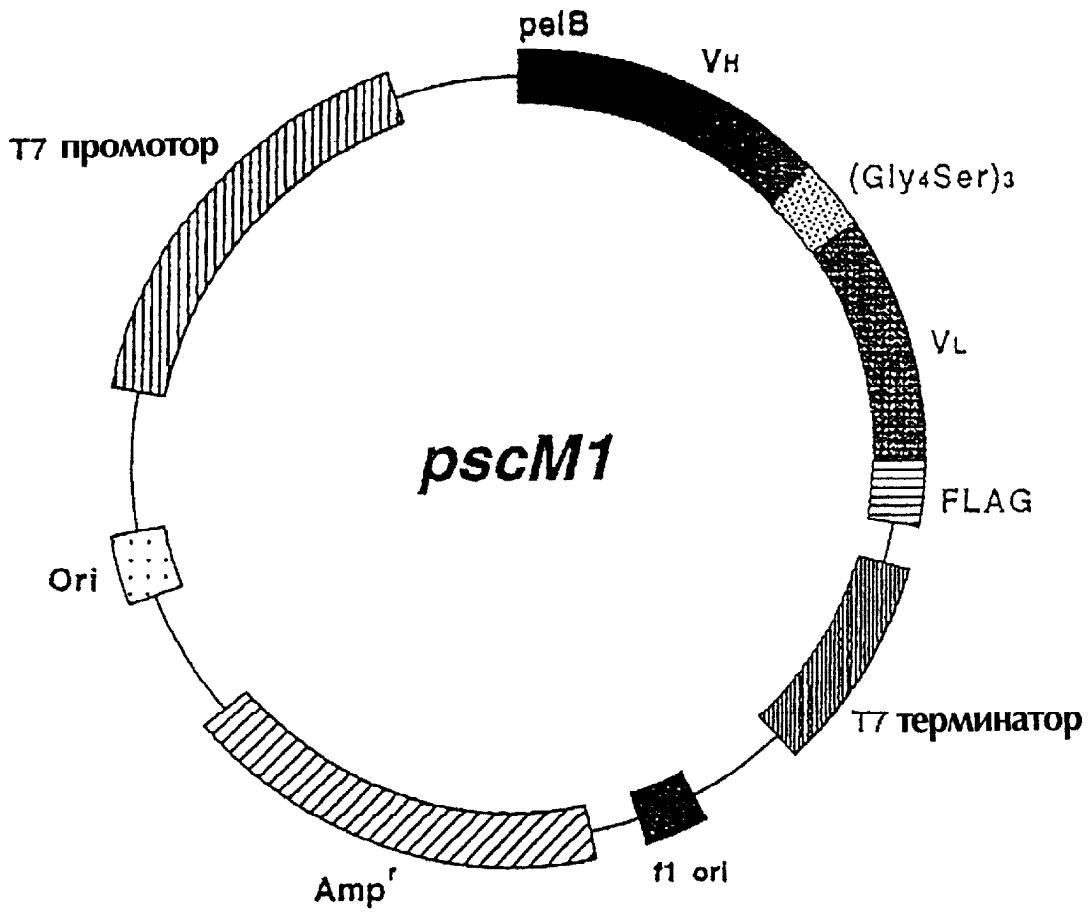
**ФИГ. 2**



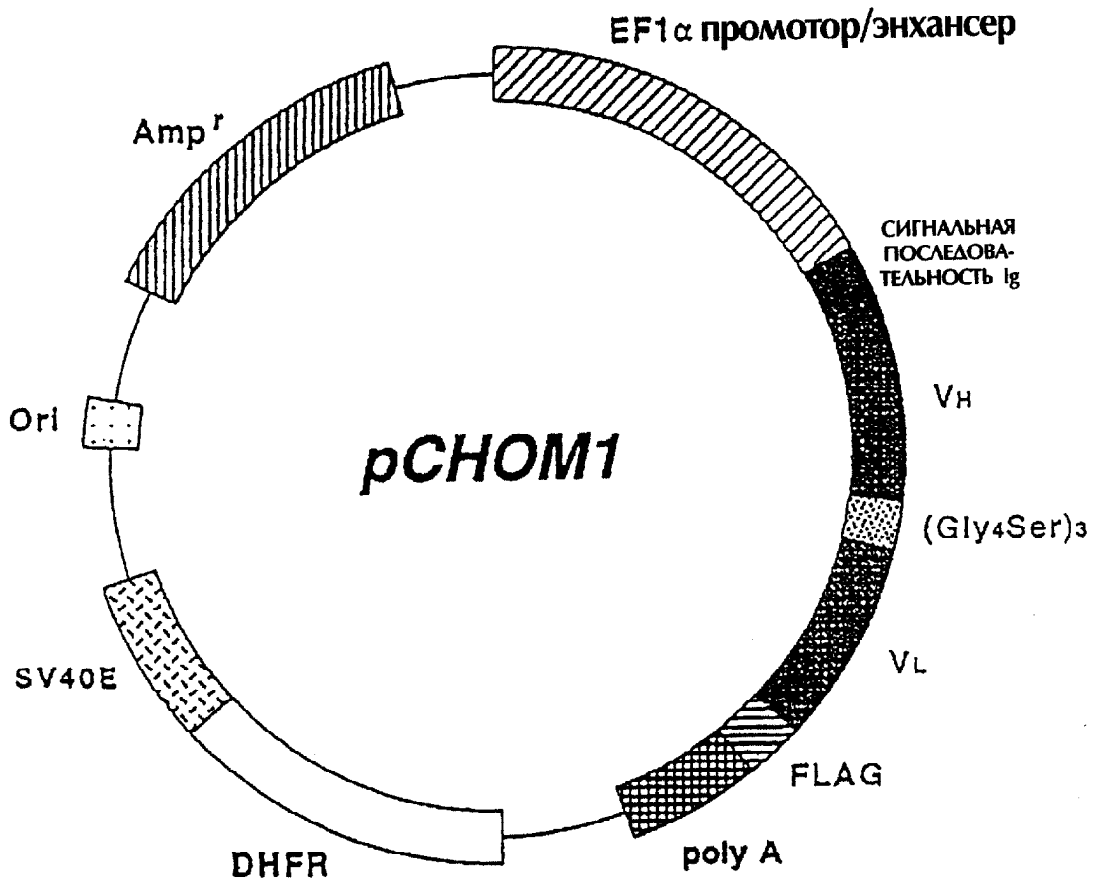
**ФИГ. 3**



ФИГ. 4

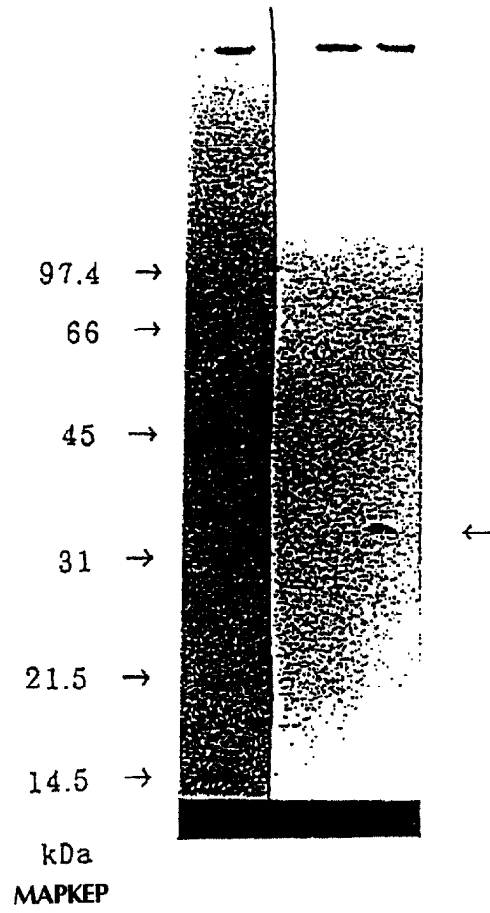


ФИГ. 5

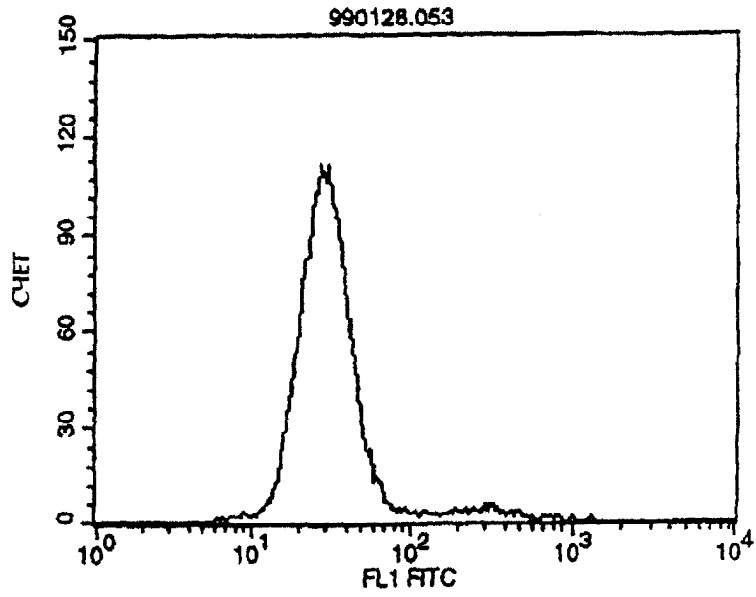


ФИГ. 6

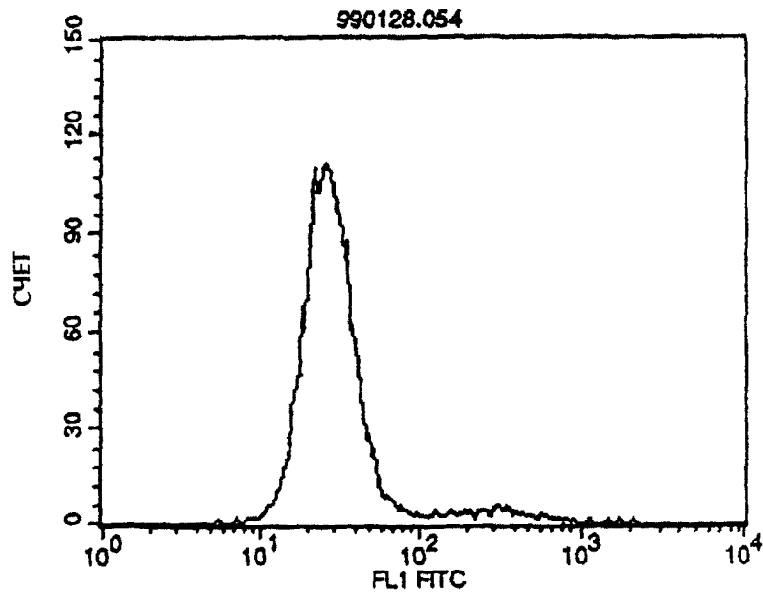




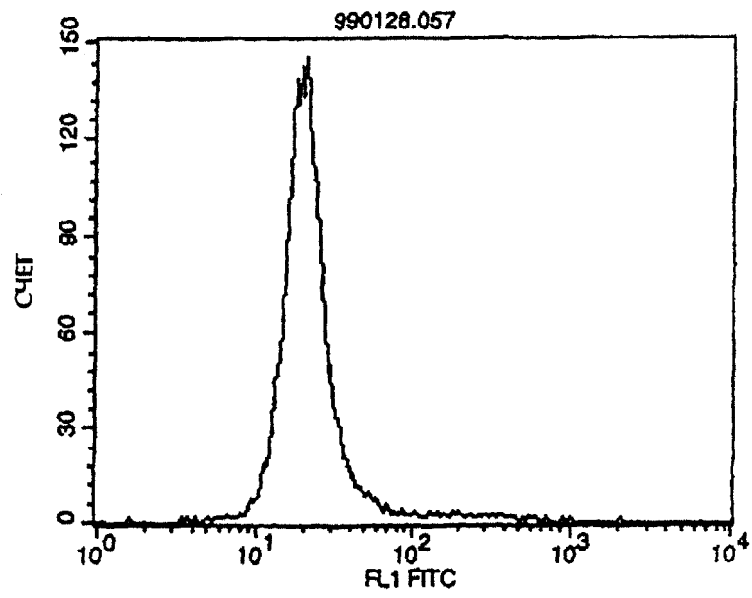
ФИГ. 7



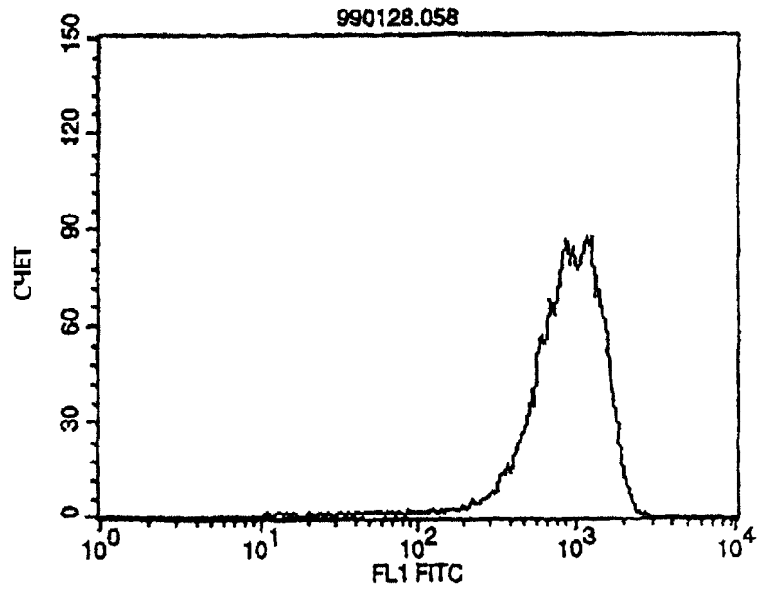
ФИГ. 8



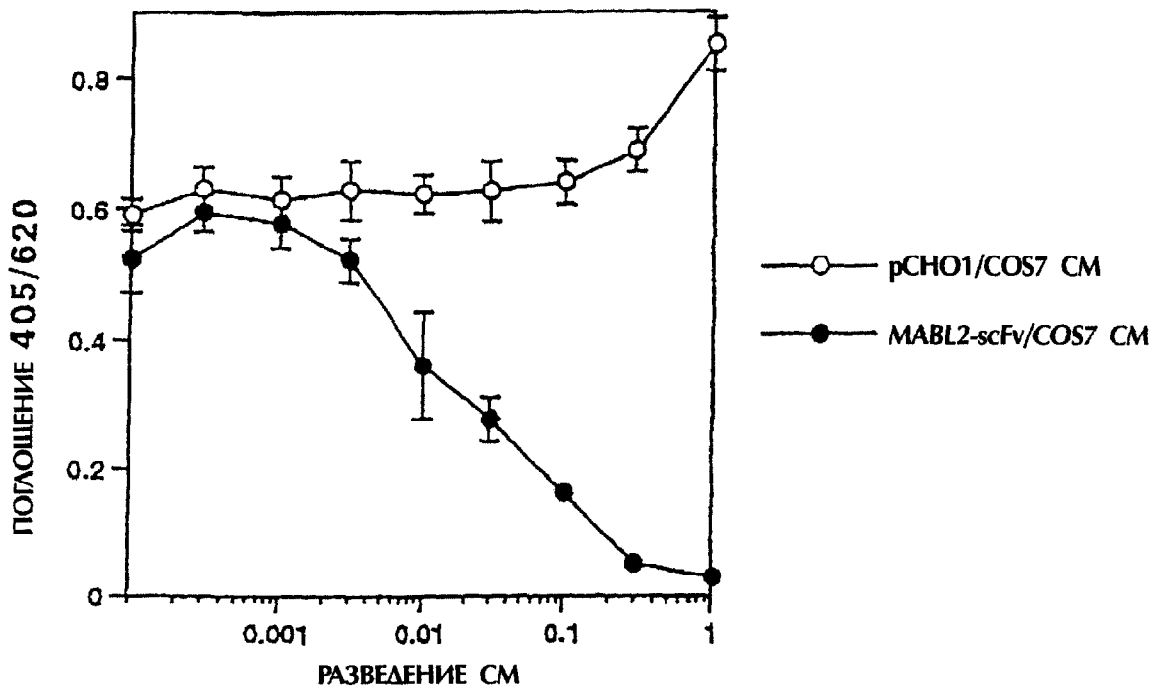
**ФИГ. 9**



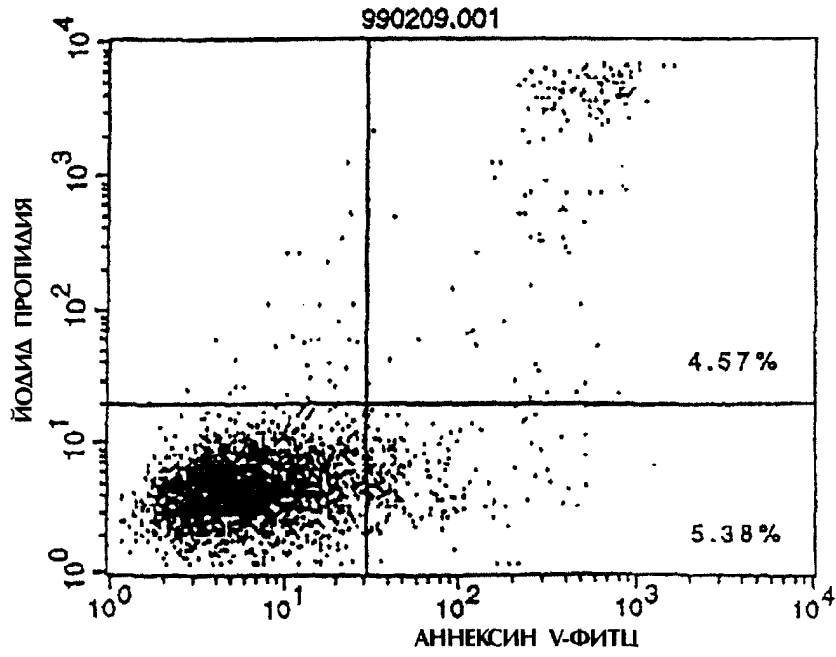
**ФИГ. 10**



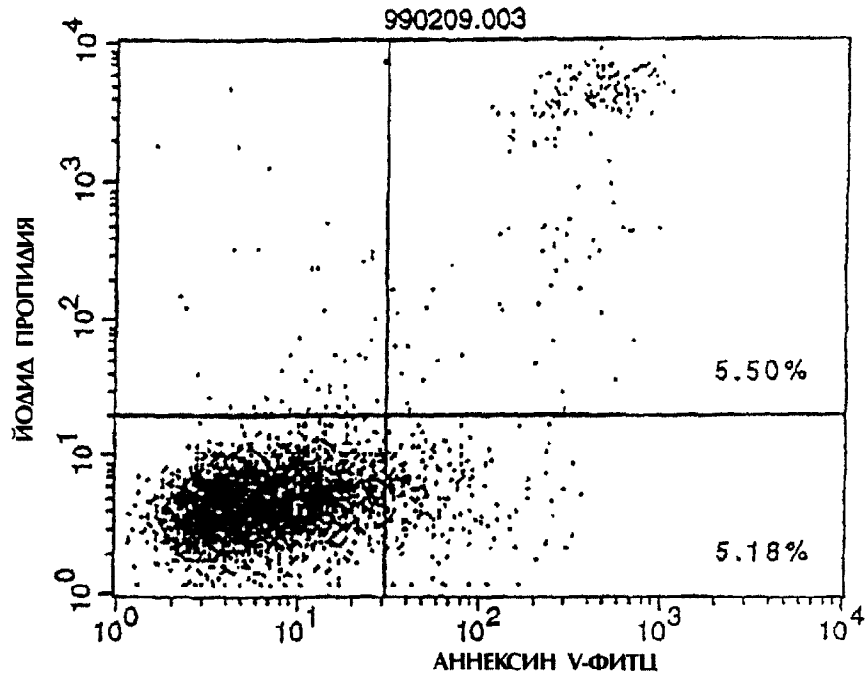
**ФИГ. 11**  
**КОНКУРЕНТНЫЙ ELISA-АНАЛИЗ**



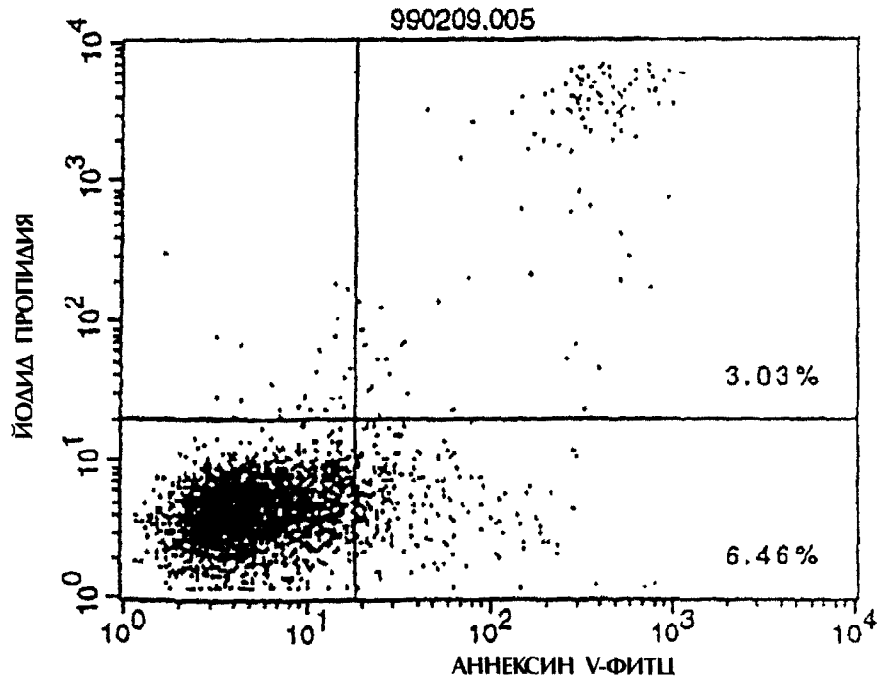
**ФИГ. 12**



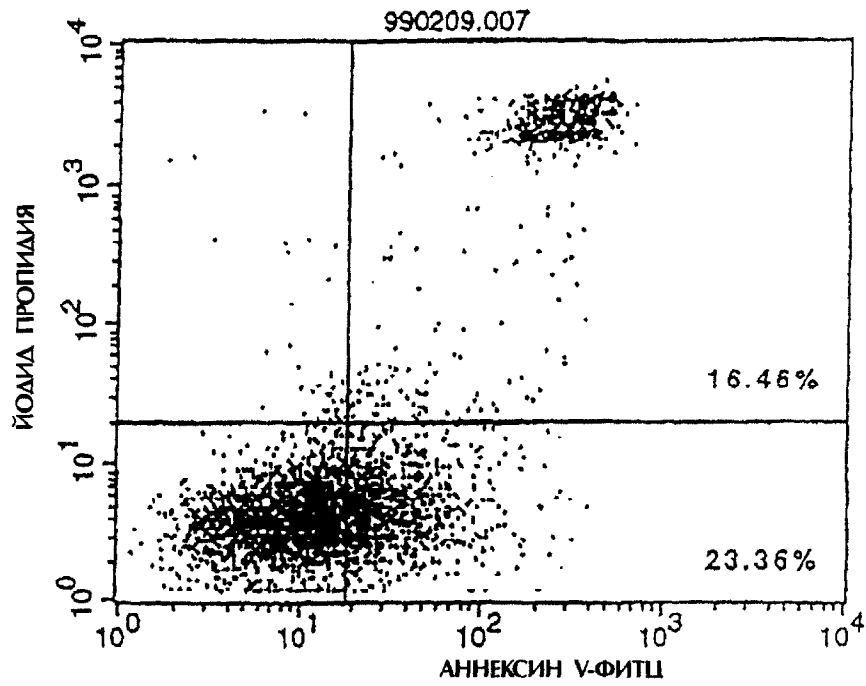
ФИГ. 13



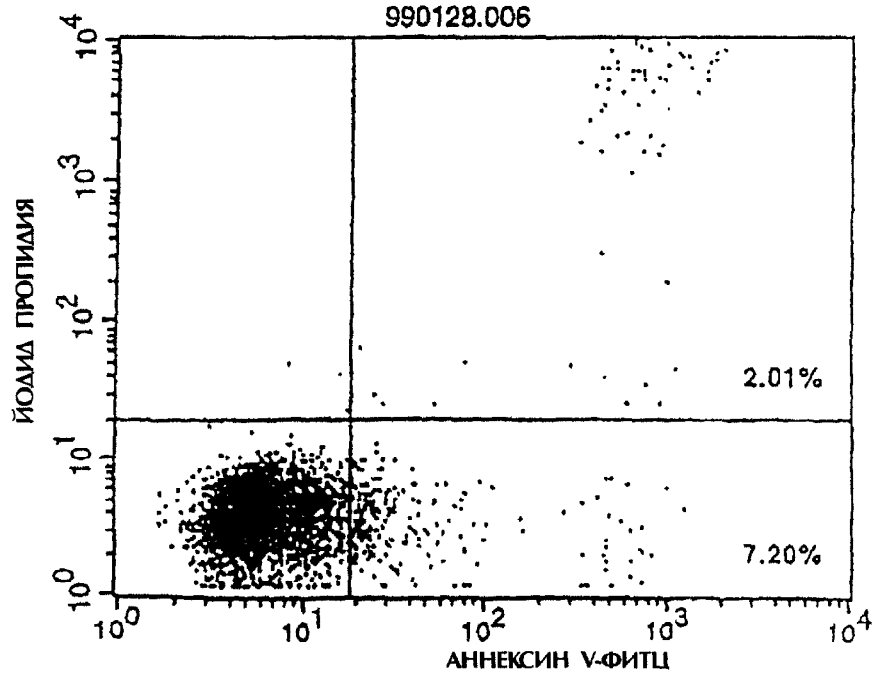
ФИГ. 14



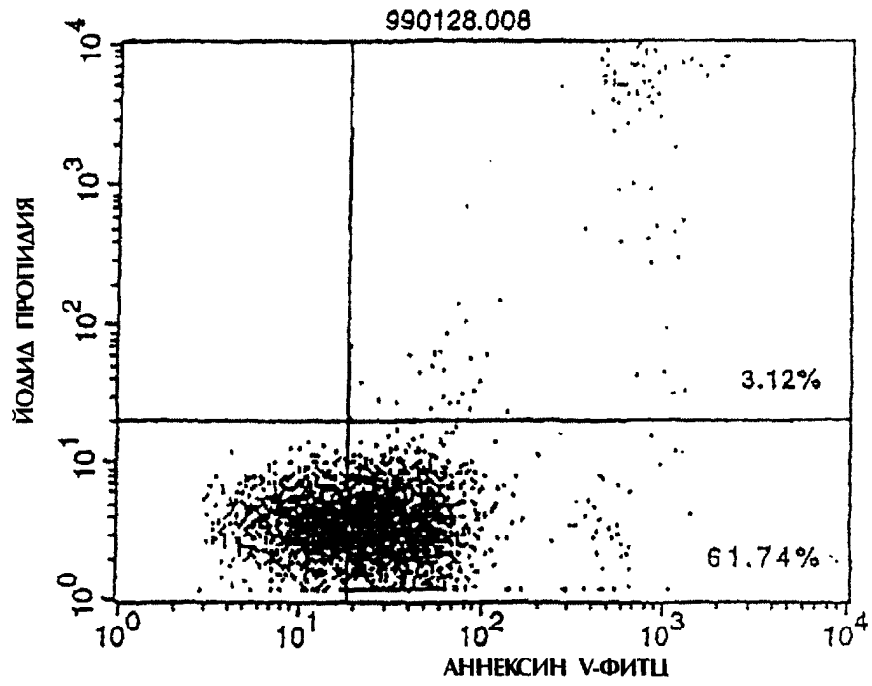
ФИГ. 15



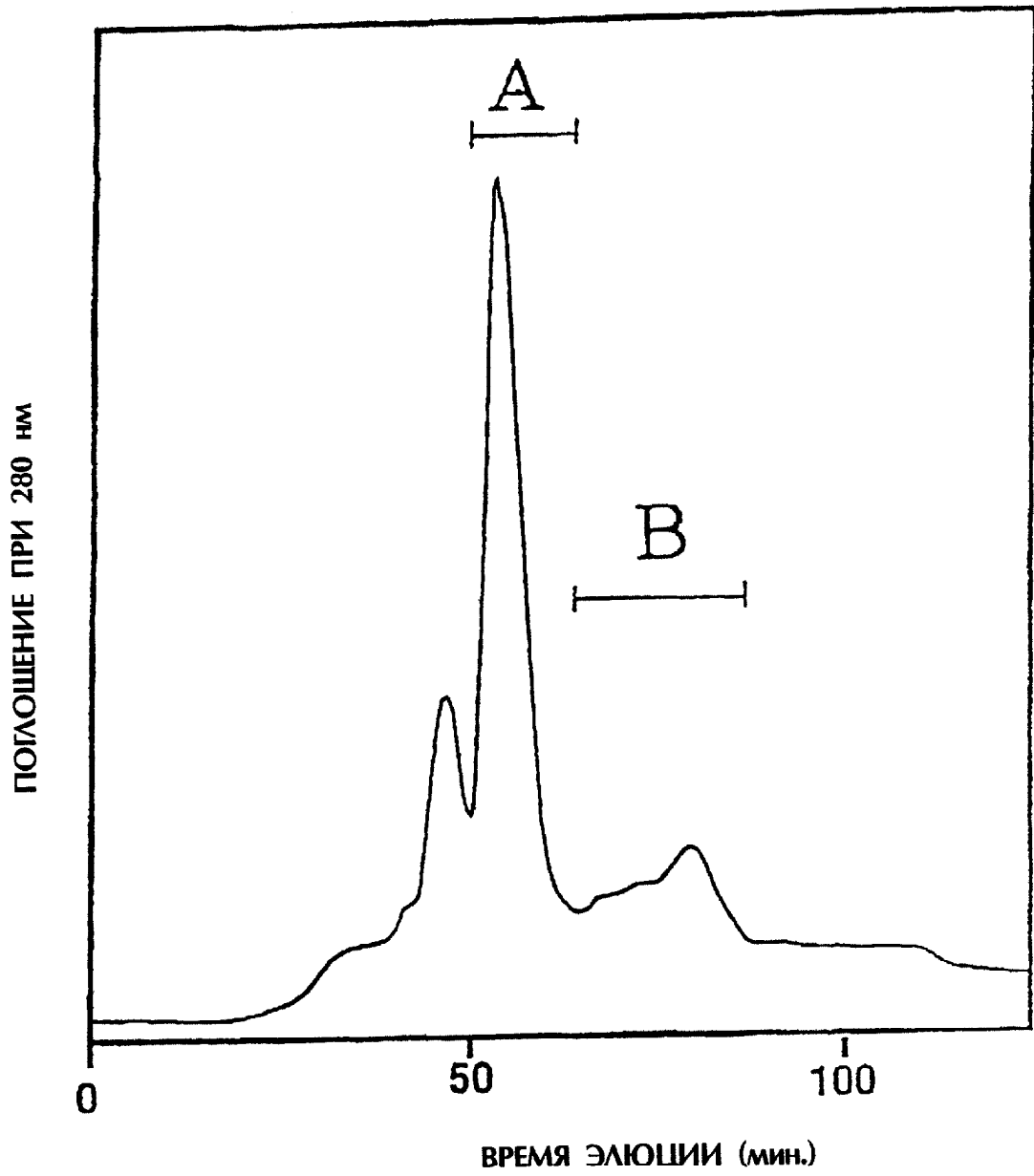
ФИГ. 16



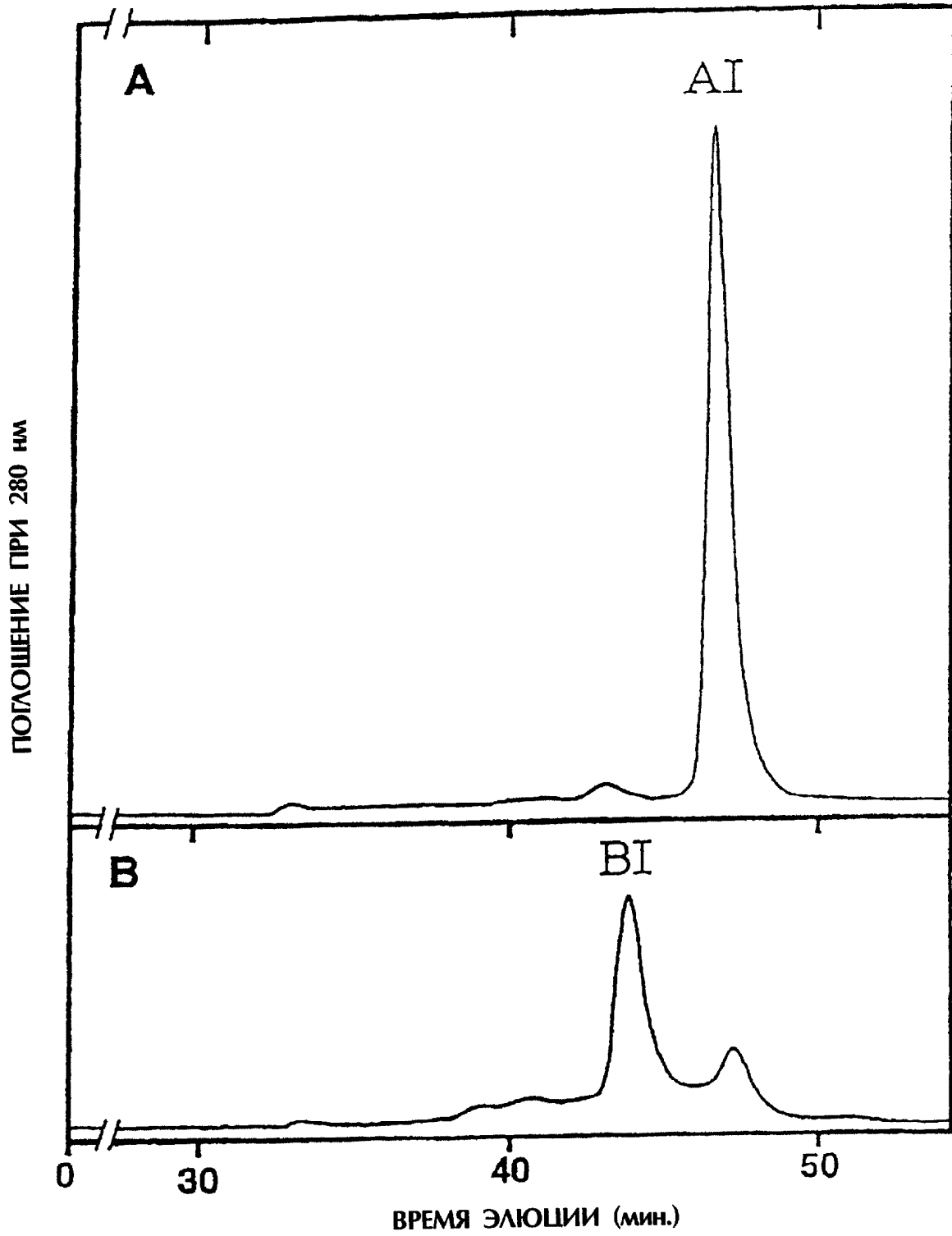
ФИГ. 17



ФИГ. 18



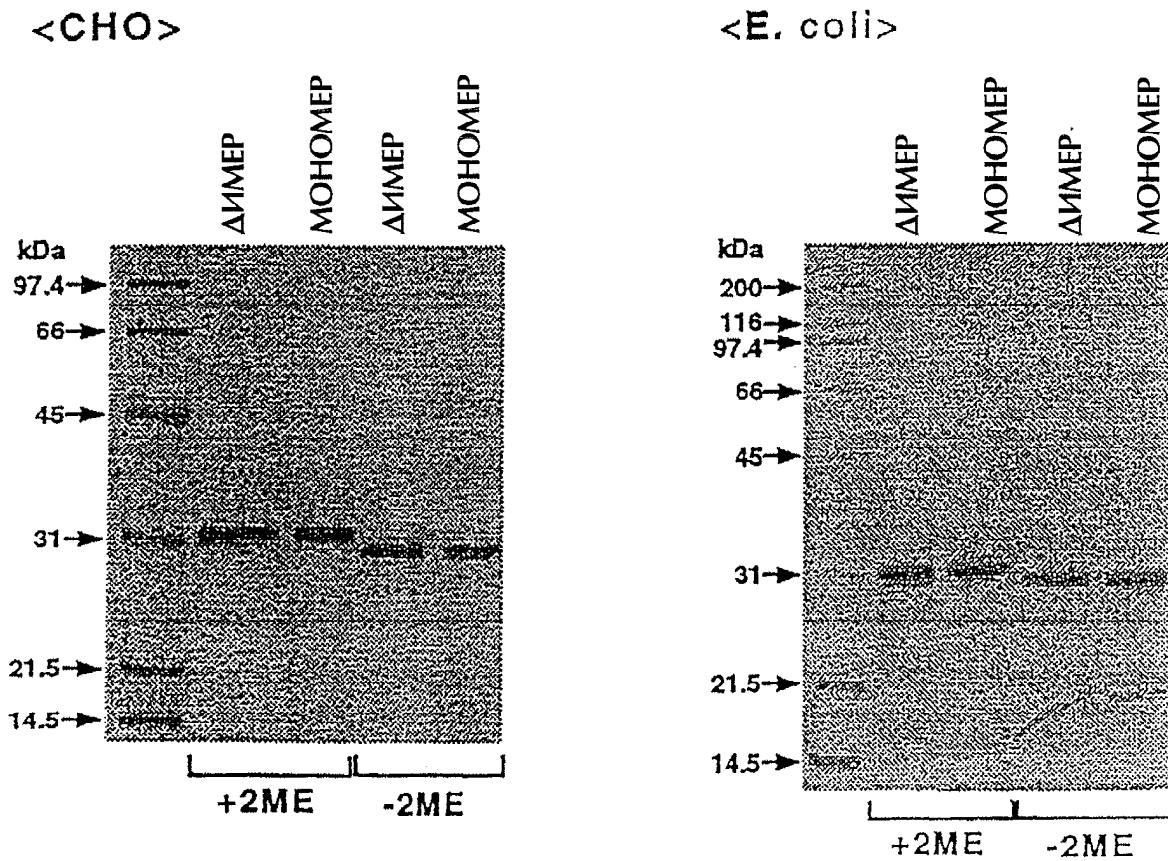
ФИГ. 19



ФИГ. 20



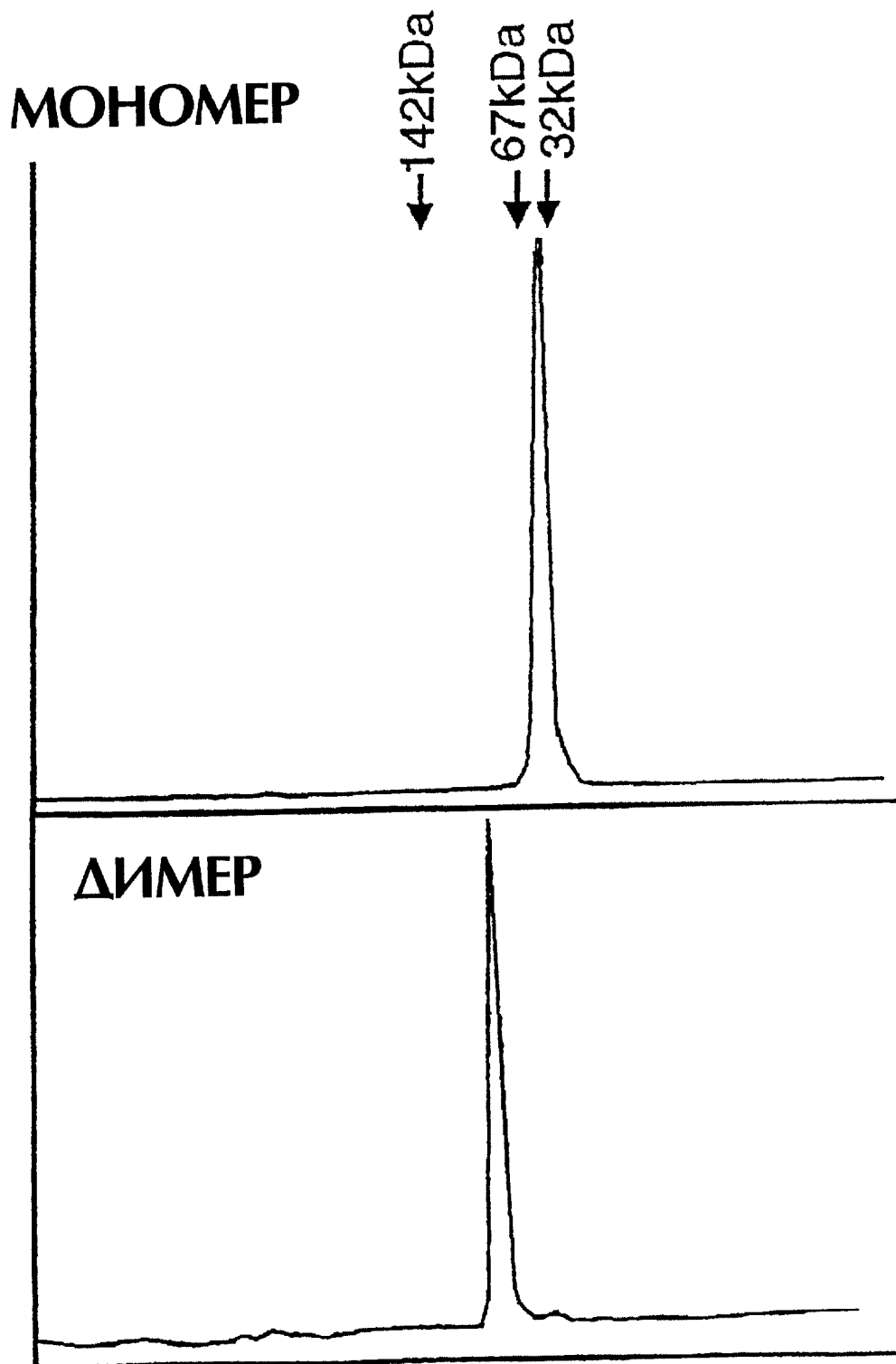
АНАЛИЗ МАВЛ-2(scFv) МЕТОДОМ SDS-PAGE



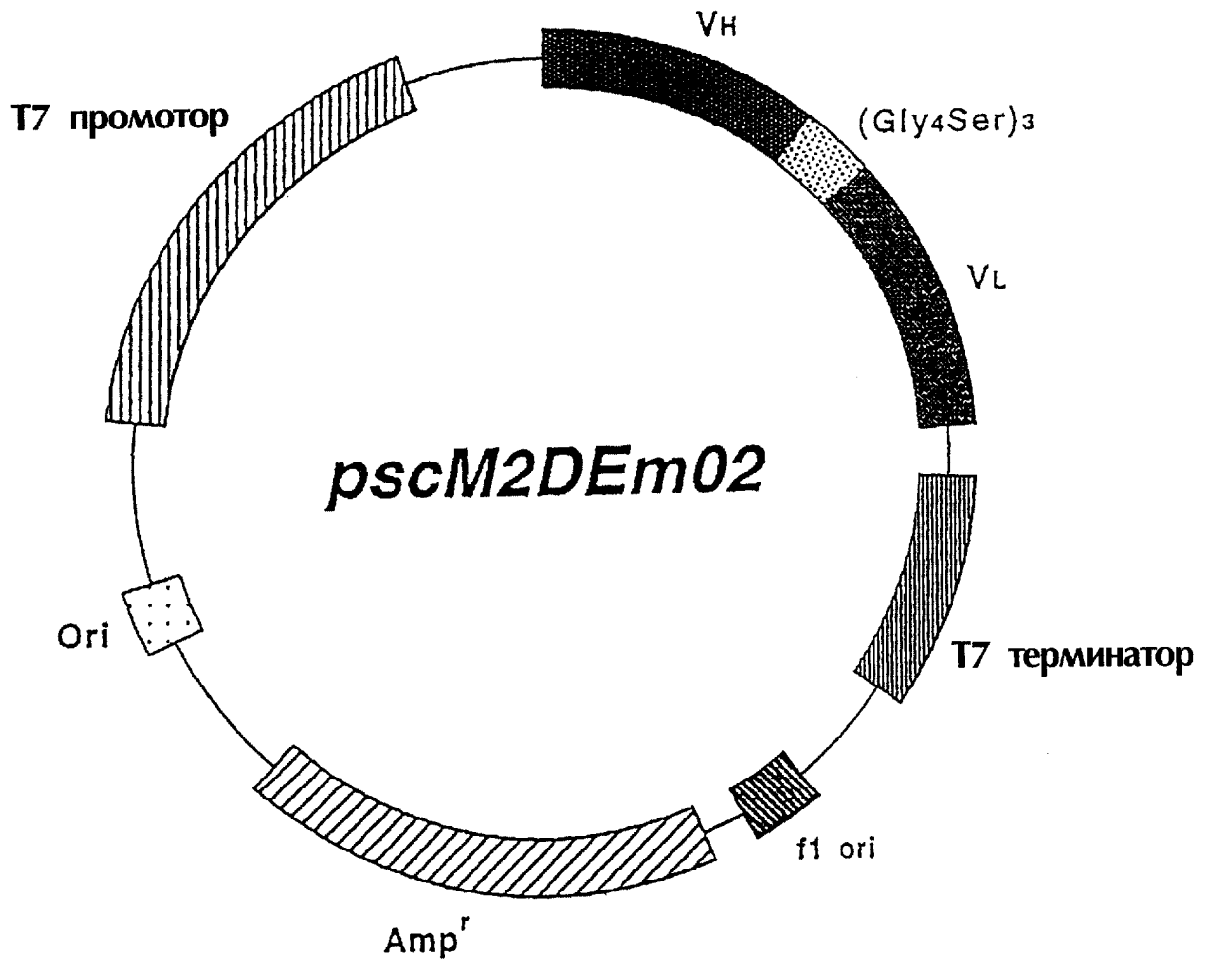
ФИГ. 21

TSK gel G3000SW

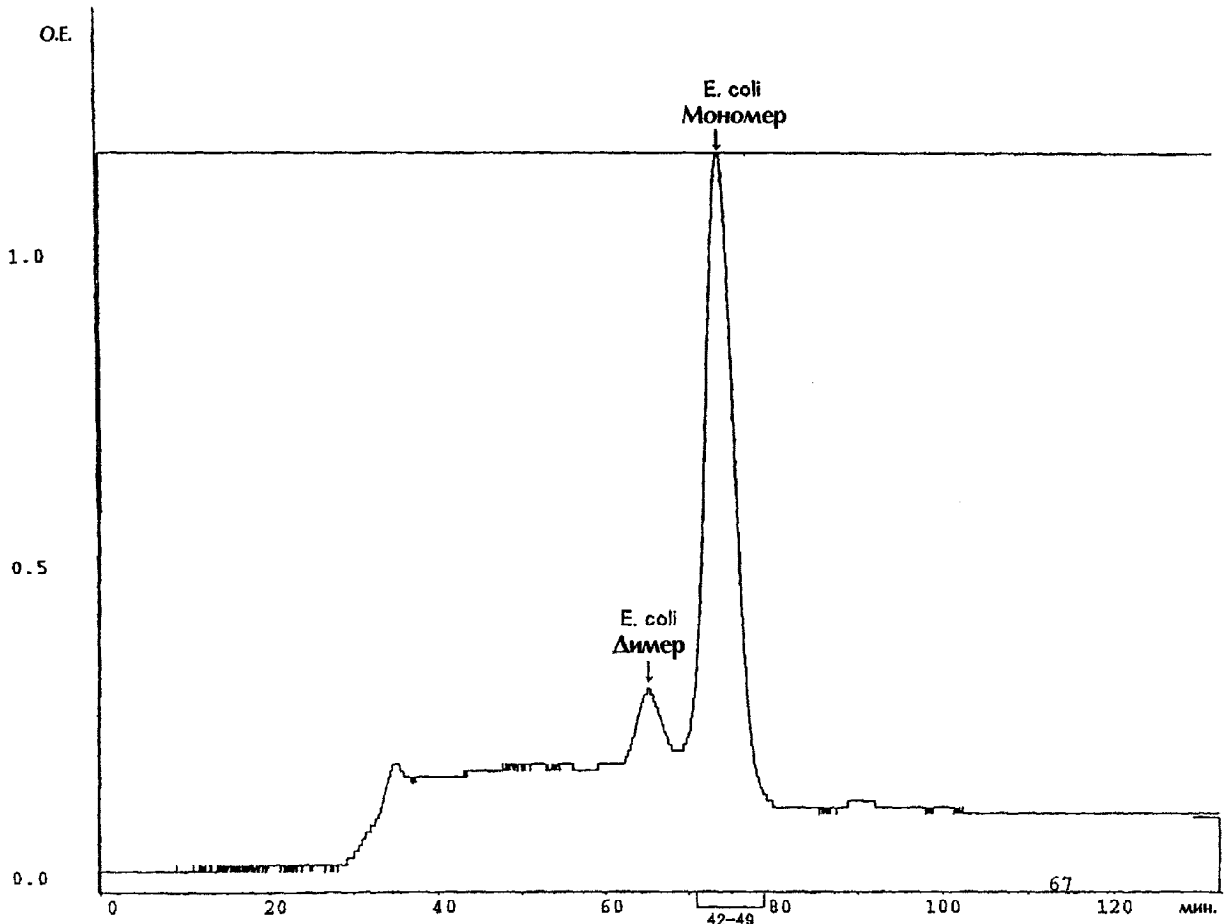
20 mM АЦЕТАТНЫЙ БУФЕР 0.15 M NaCl, pH 6.0



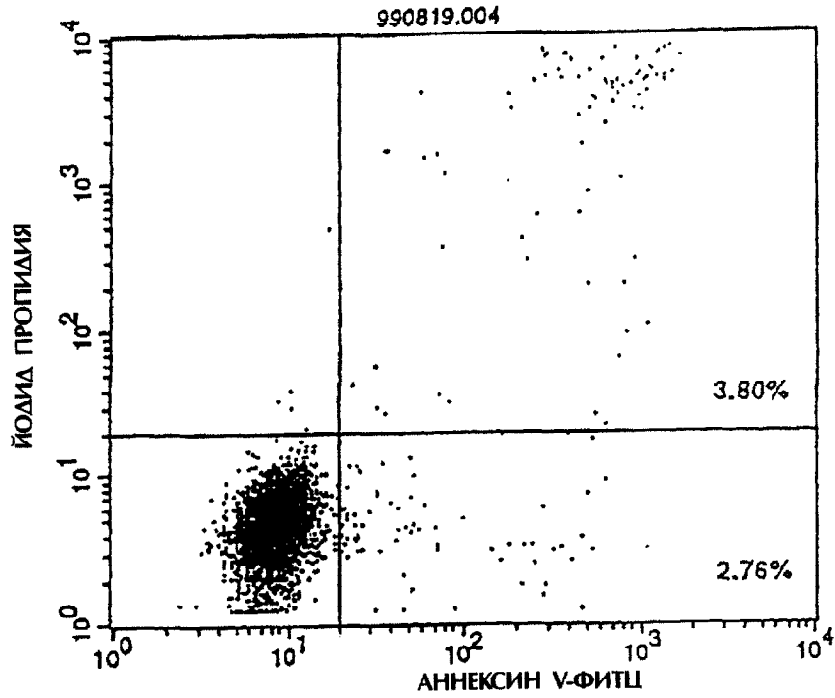
ФИГ. 22



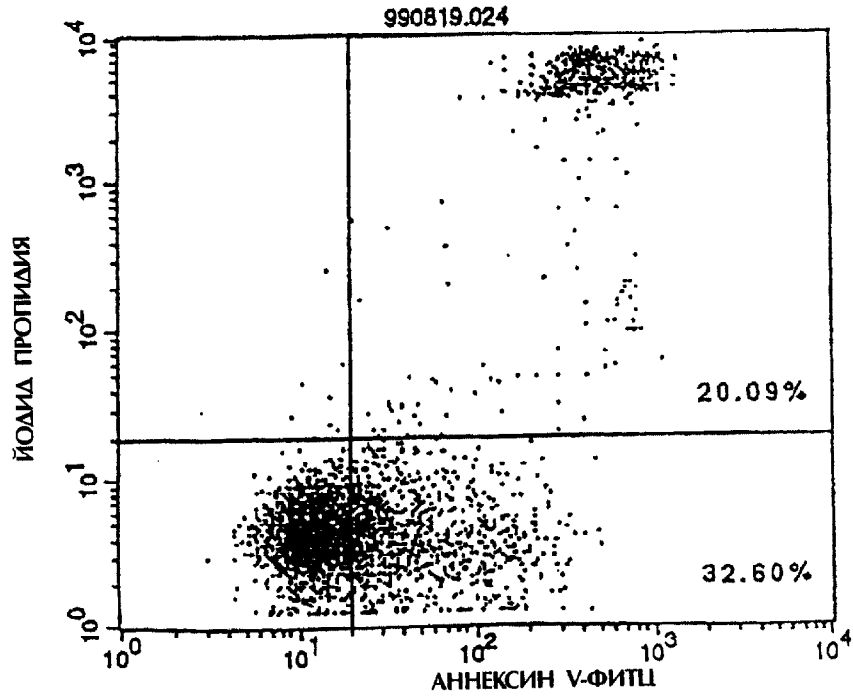
ФИГ. 23



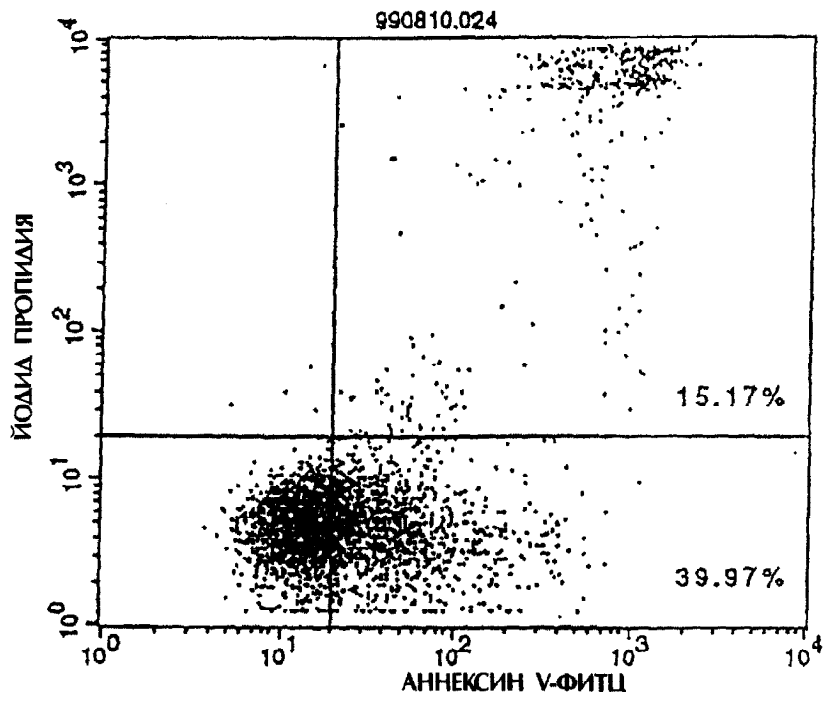
ФИГ. 24



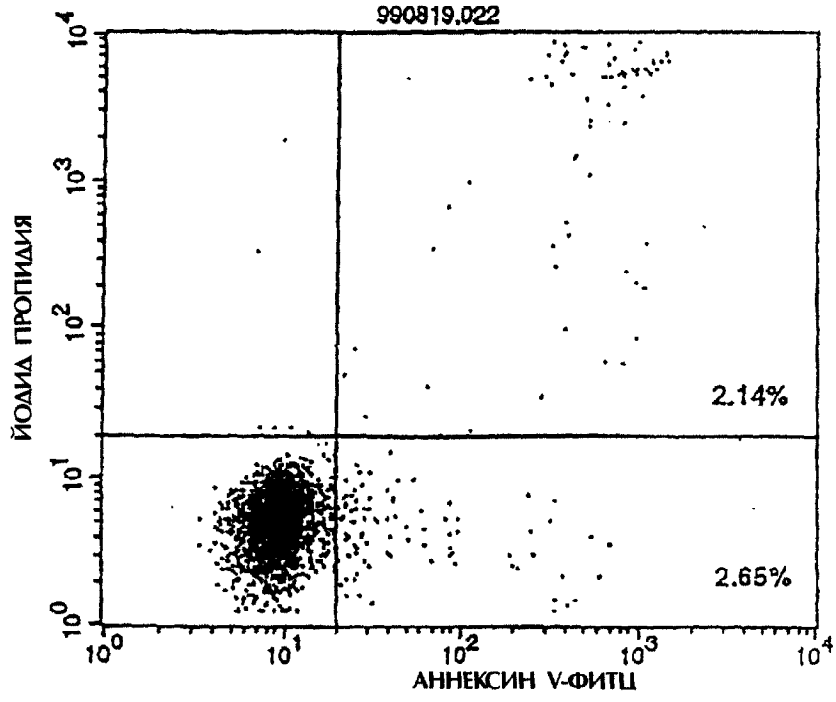
ФИГ. 25



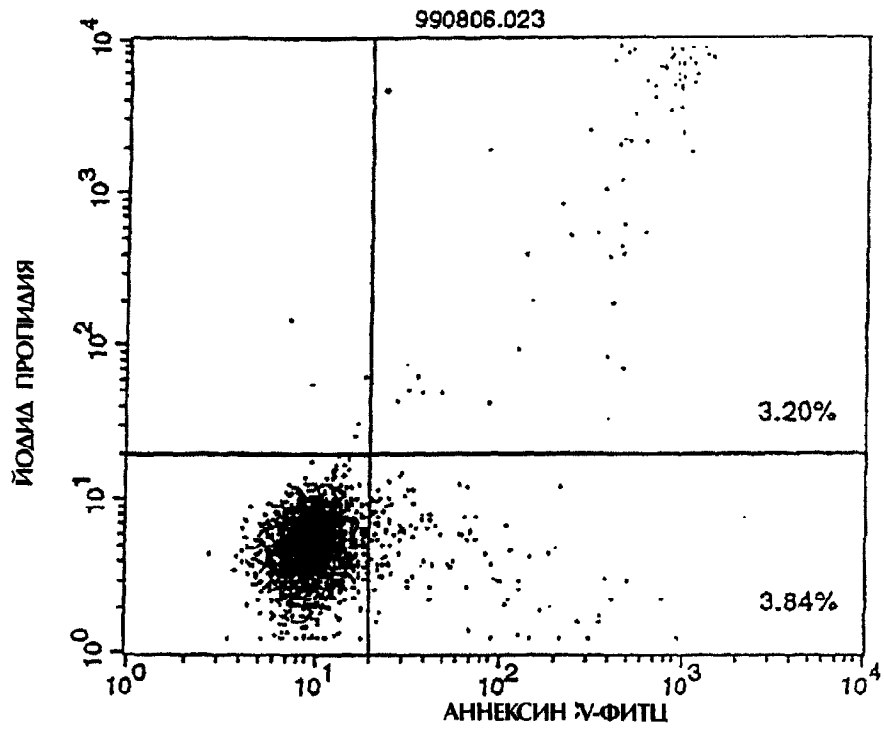
ФИГ. 26



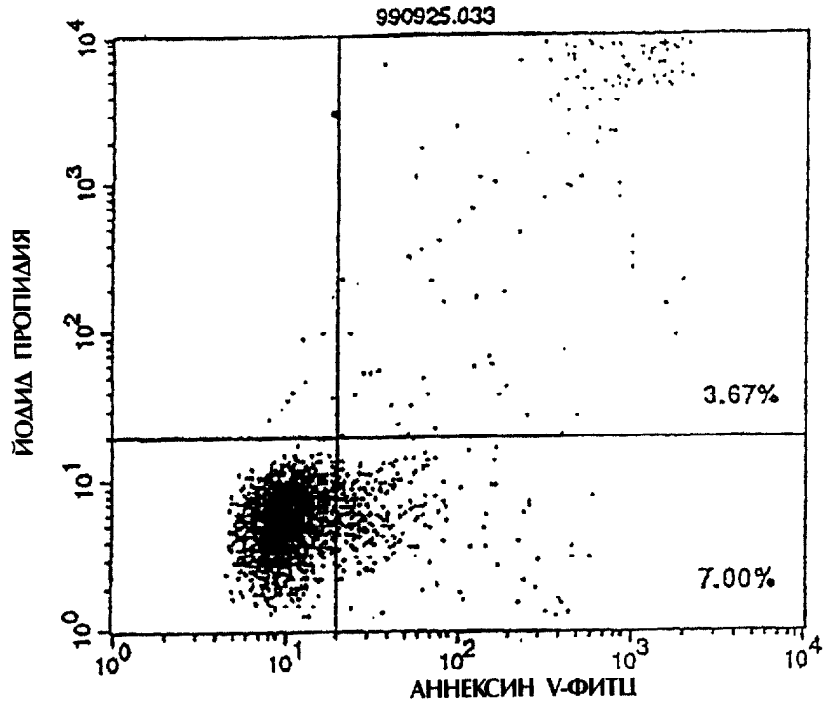
ФИГ. 27



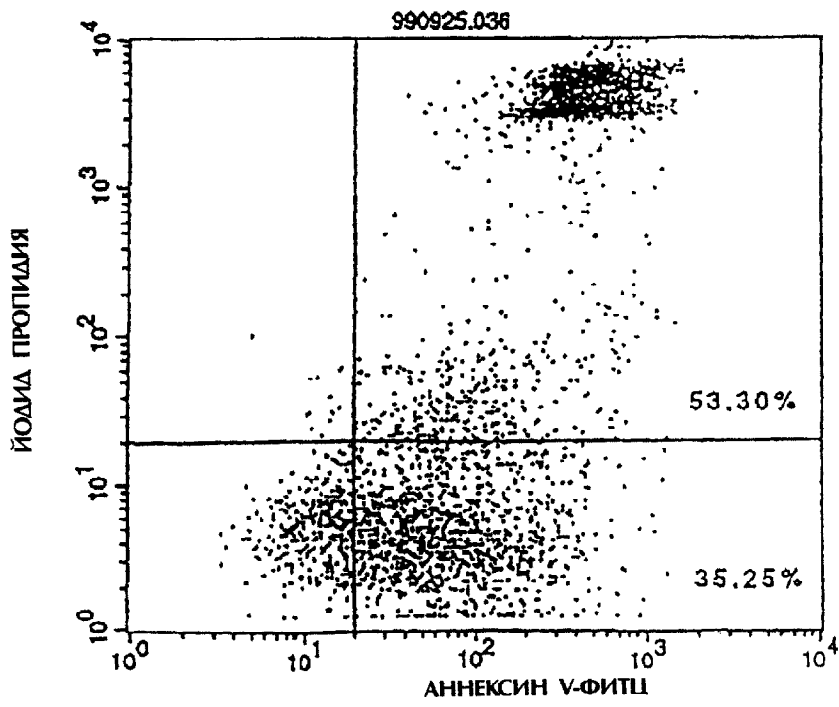
ФИГ. 28



ФИГ. 29

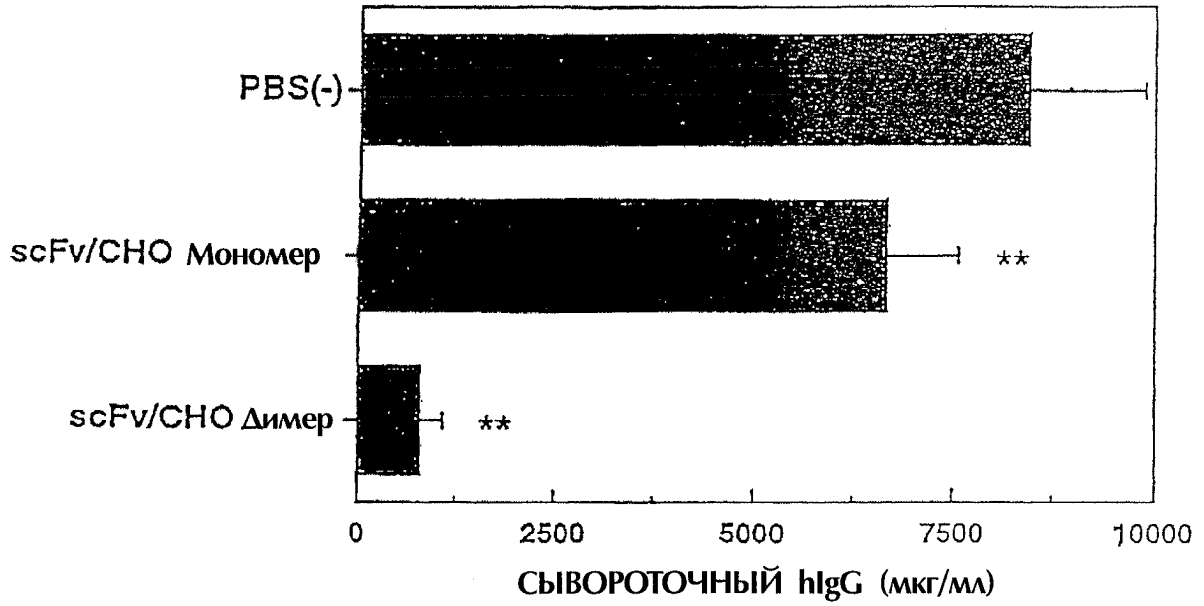


ФИГ. 30



ФИГ. 31

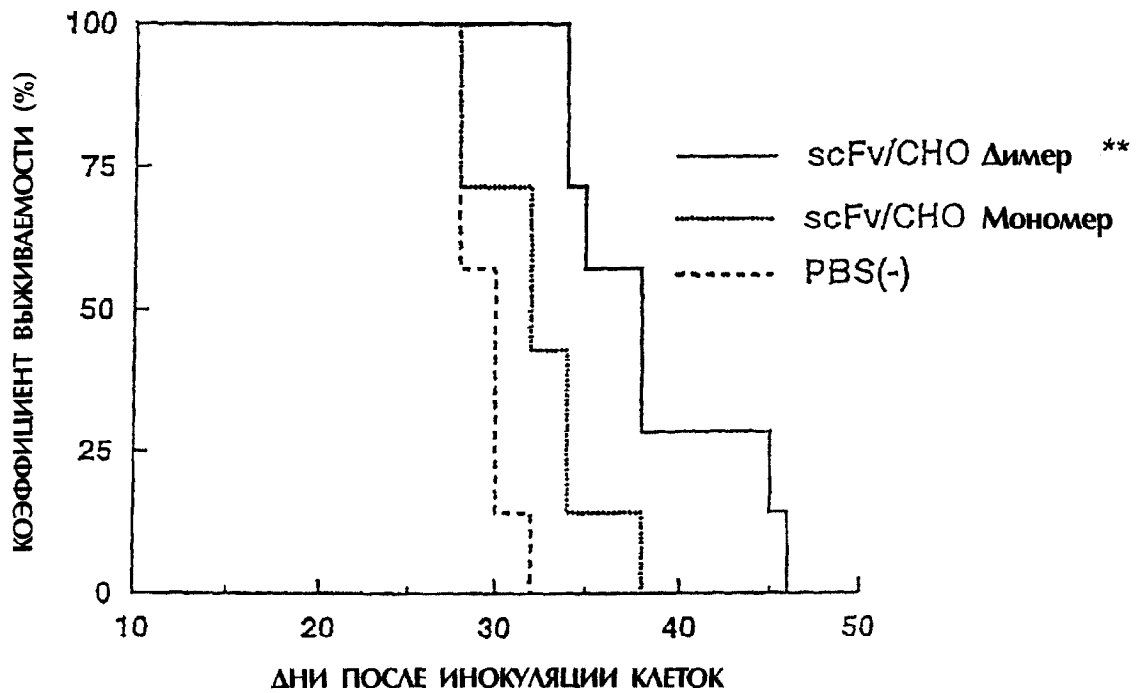
ЭФФЕКТ МАВЛ-2(scFv) НА hlgG В СЫВОРОТКЕ SCID МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КРММ2



\*\* : p<0.01

ФИГ. 32

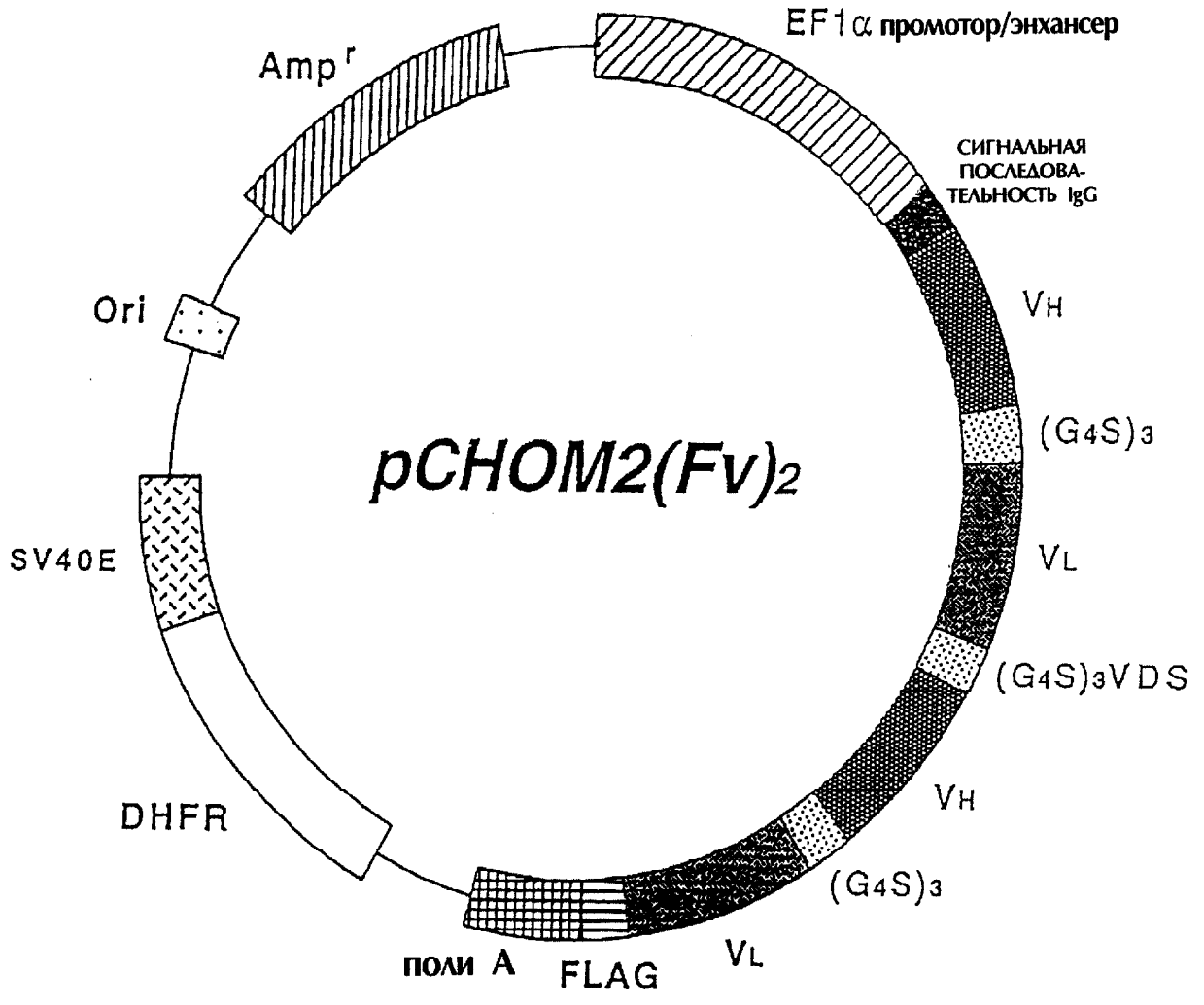
ЭФФЕКТ МАВЛ-2(scFv) НА ВЫЖИВАНИЕ SCID МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КРММ2



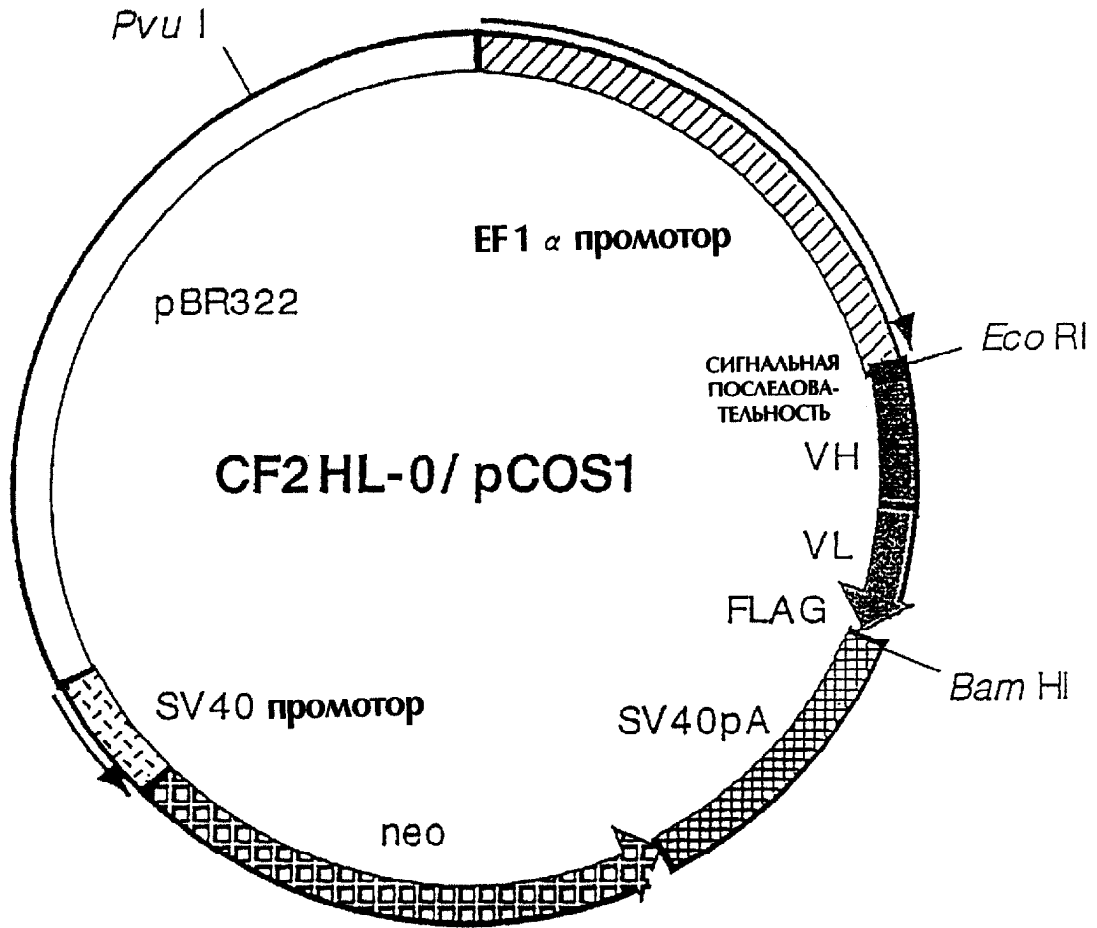
\*\* ; P<0.01 по t-критерию

ФИГ. 33



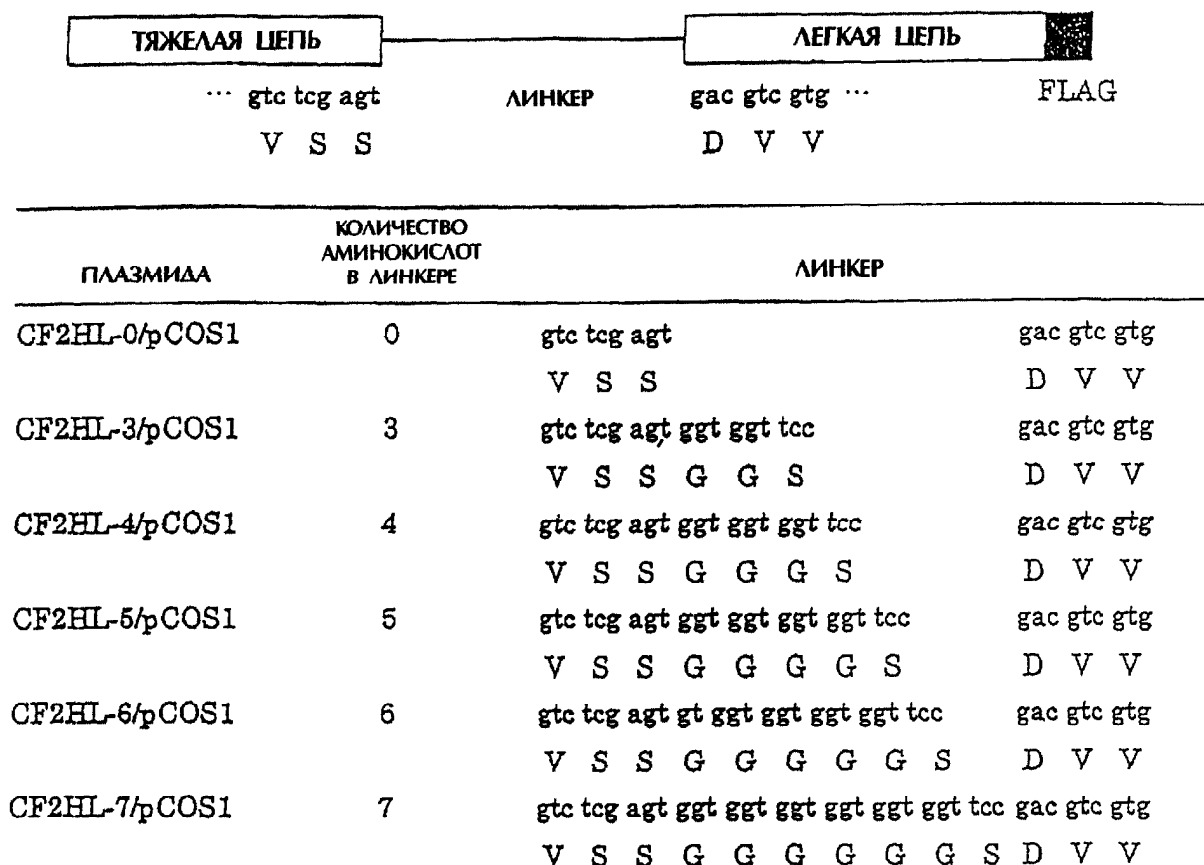


**ФИГ. 34**

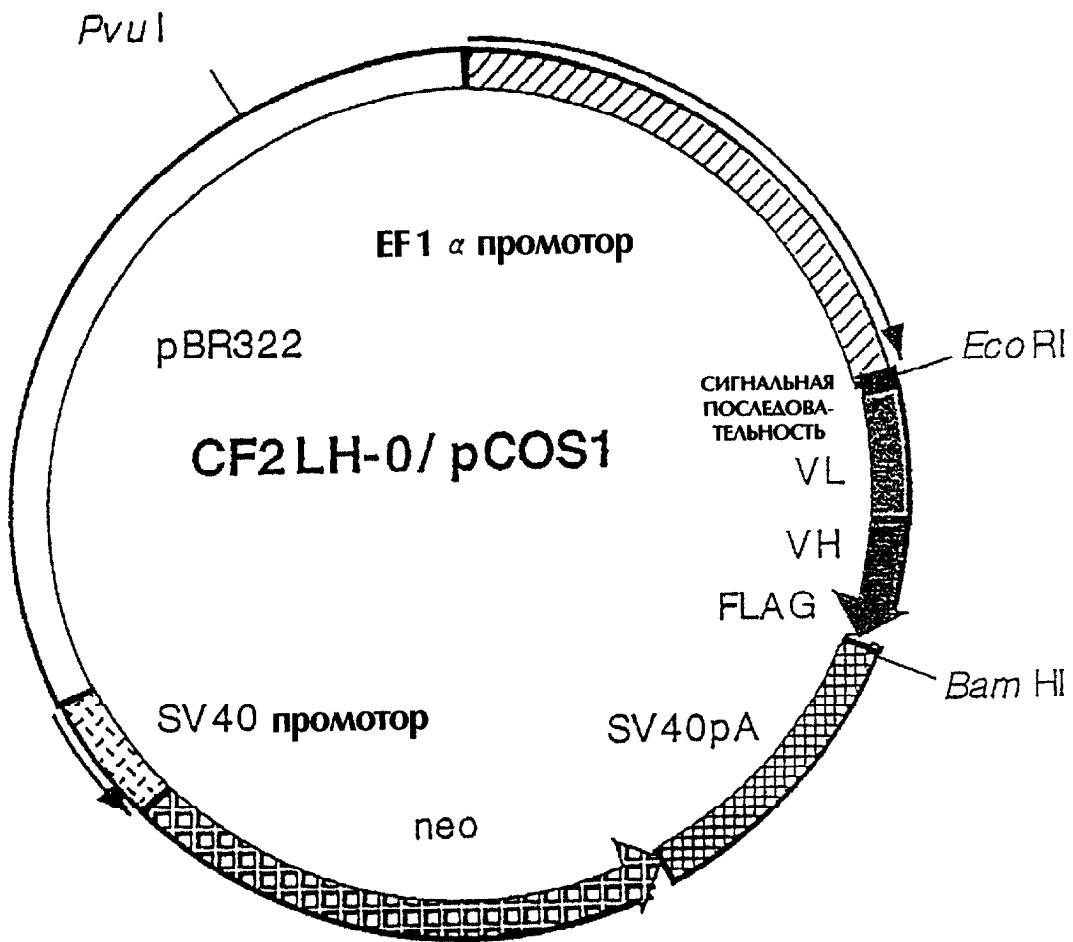


ФИГ. 35

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЛИНКЕРА ДЛЯ HL-ТИПА

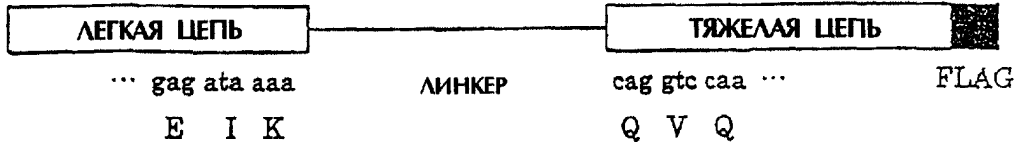


ФИГ. 36



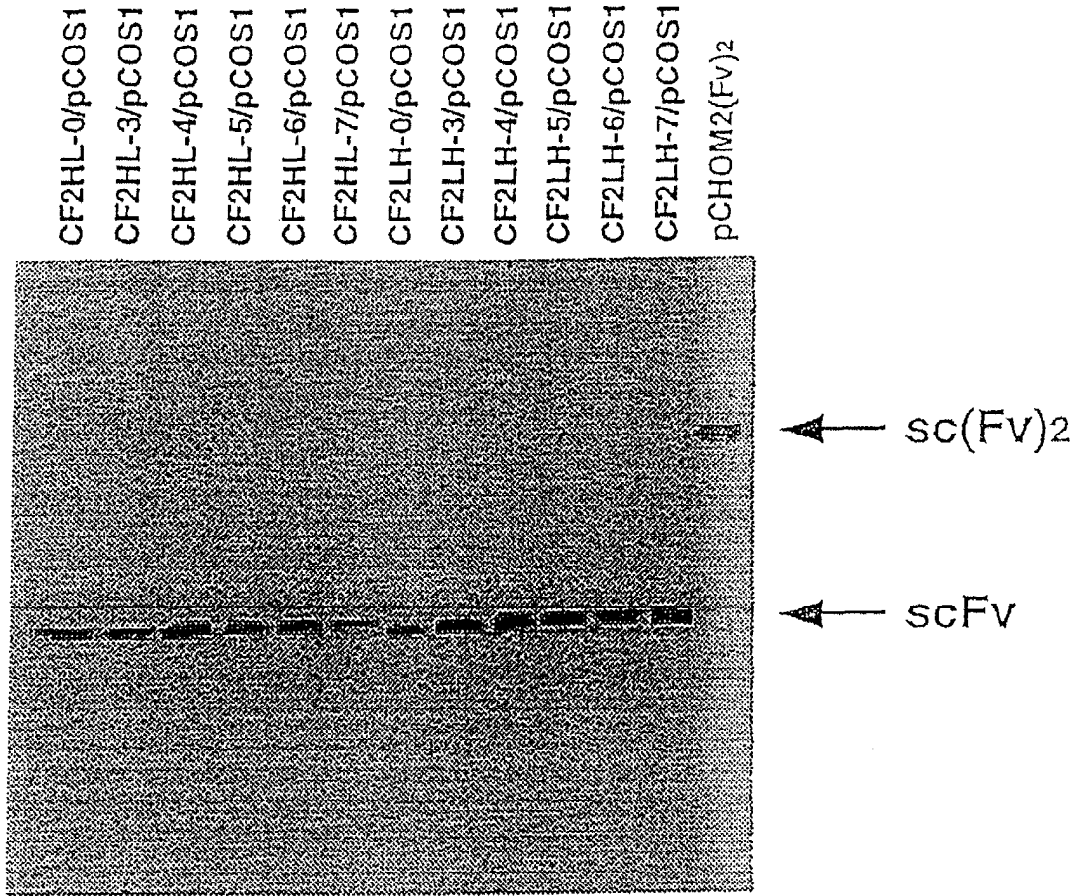
ФИГ. 37

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И АМИНОКИСЛОТНАЯ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЛИНКЕРА ДЛЯ LH-ТИПА

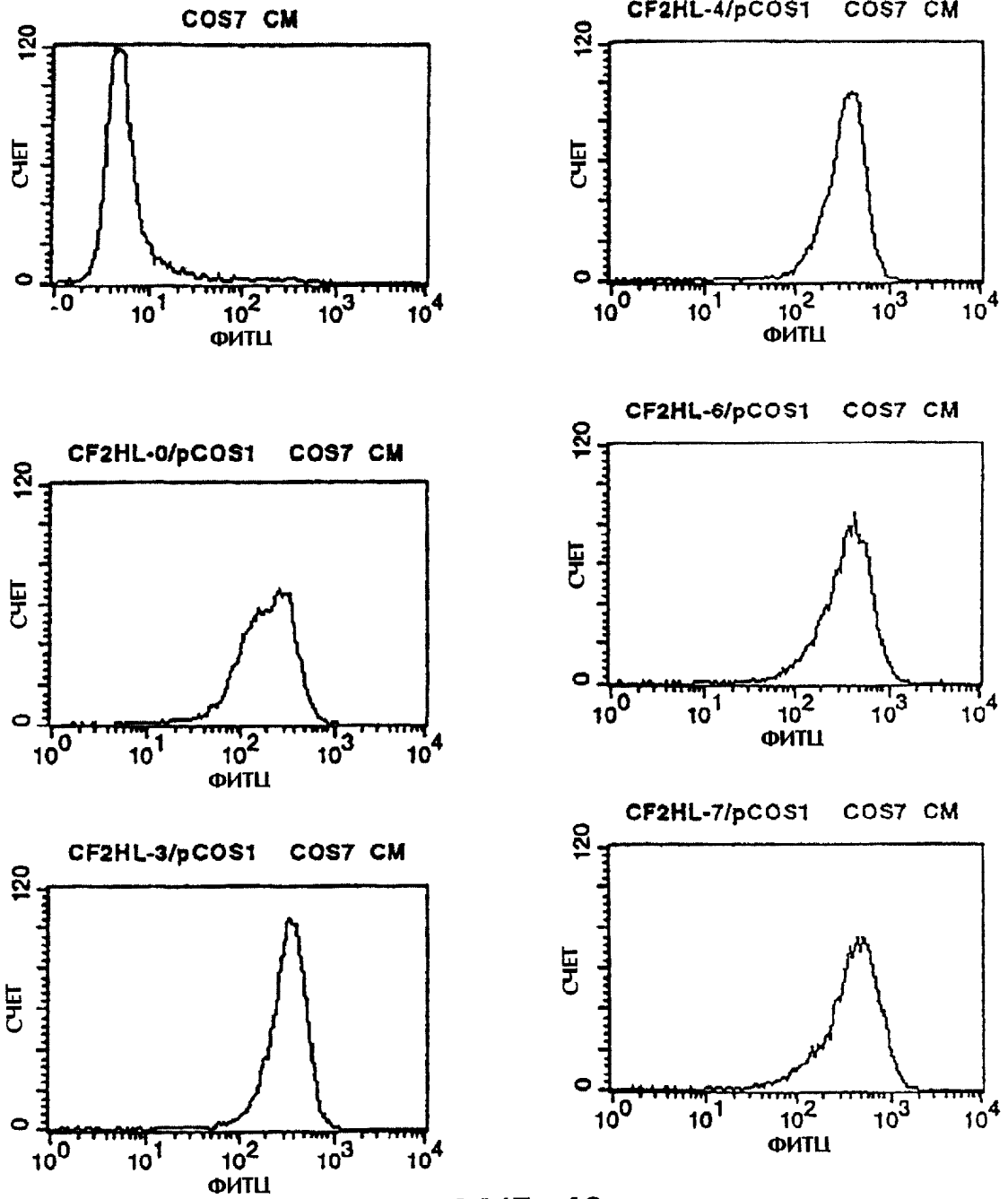


ПЛАЗМИДА	КОЛИЧЕСТВО АМИНОКИСЛОТ В ЛИНКЕРЕ	ЛИНКЕР	
CF2LH-0/pCOS1	0	gag ata aaa E I K	cag gtc caa Q V Q
CF2LH-3/pCOS1	3	gag ata aaa tcc gga ggc E I K S G G	cag gtc caa Q V Q
CF2LH-4/pCOS1	4	gag ata aaa tcc gga ggt ggc E I K S G G G	cag gtc caa Q V Q
CF2LH-5/pCOS1	5	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc E I K S G G G G	cag gtc caa Q V Q
CF2LH-6/pCOS1	6	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc E I K S G G G G G	cag gtc caa Q V Q
CF2LH-7/pCOS1	7	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc E I K S G G G G G G	cag gtc caa Q V Q

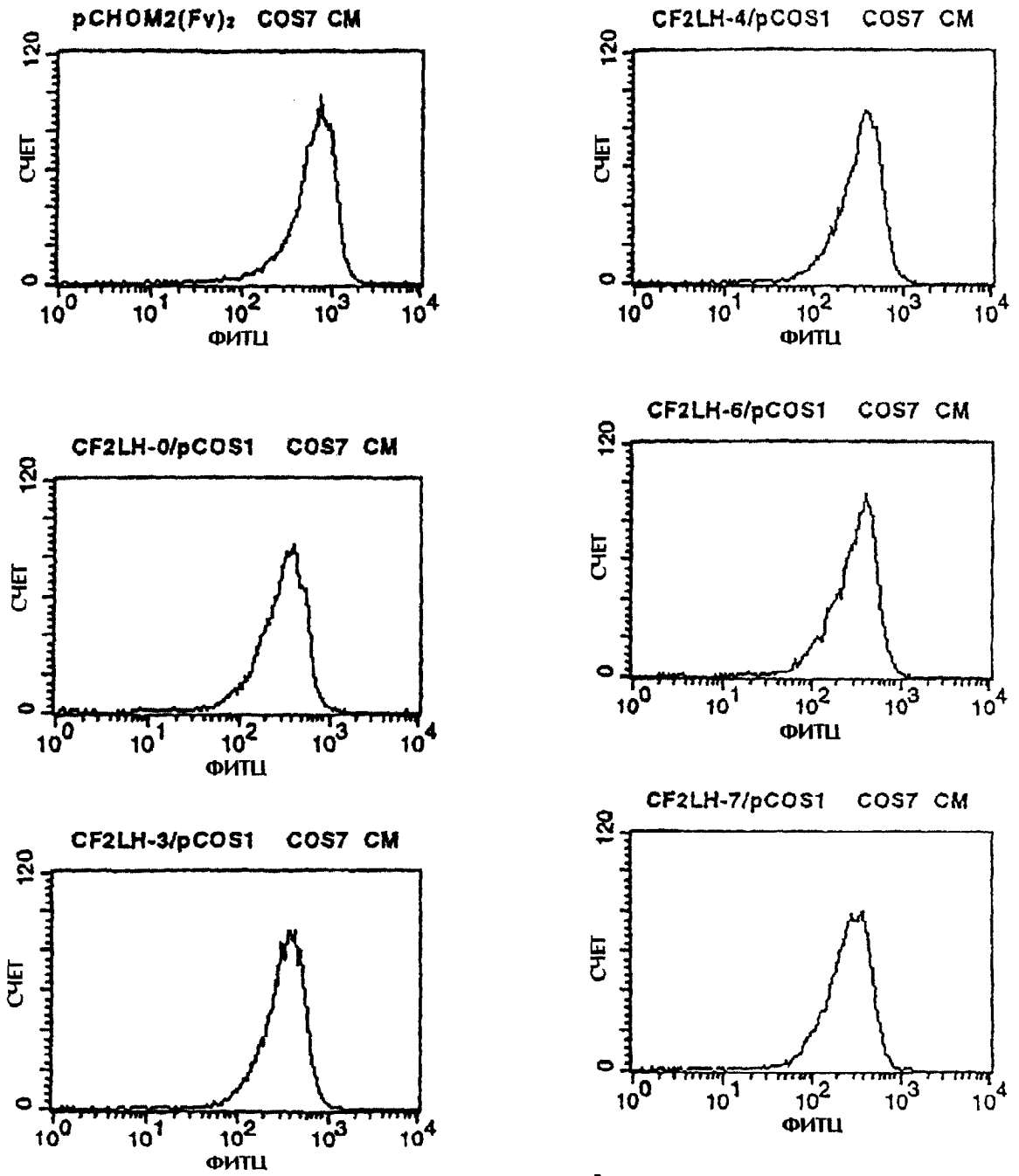
ФИГ. 38



ФИГ. 39

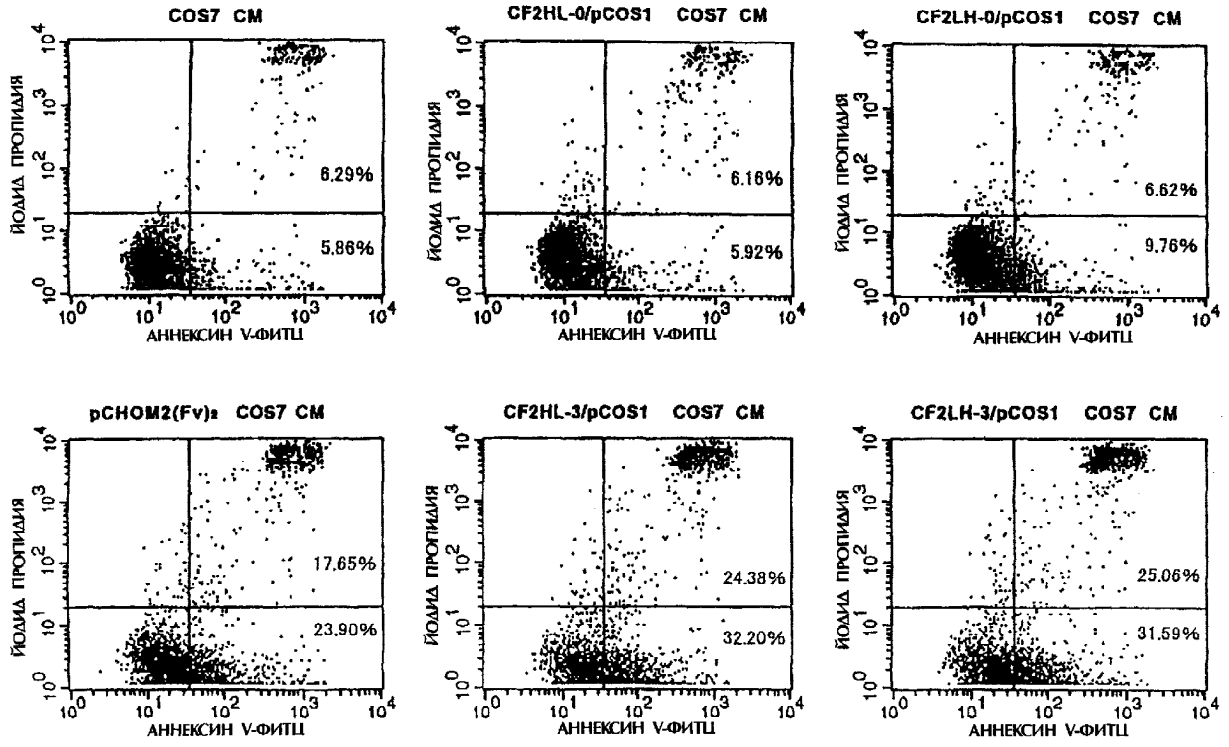


ФИГ. 40а

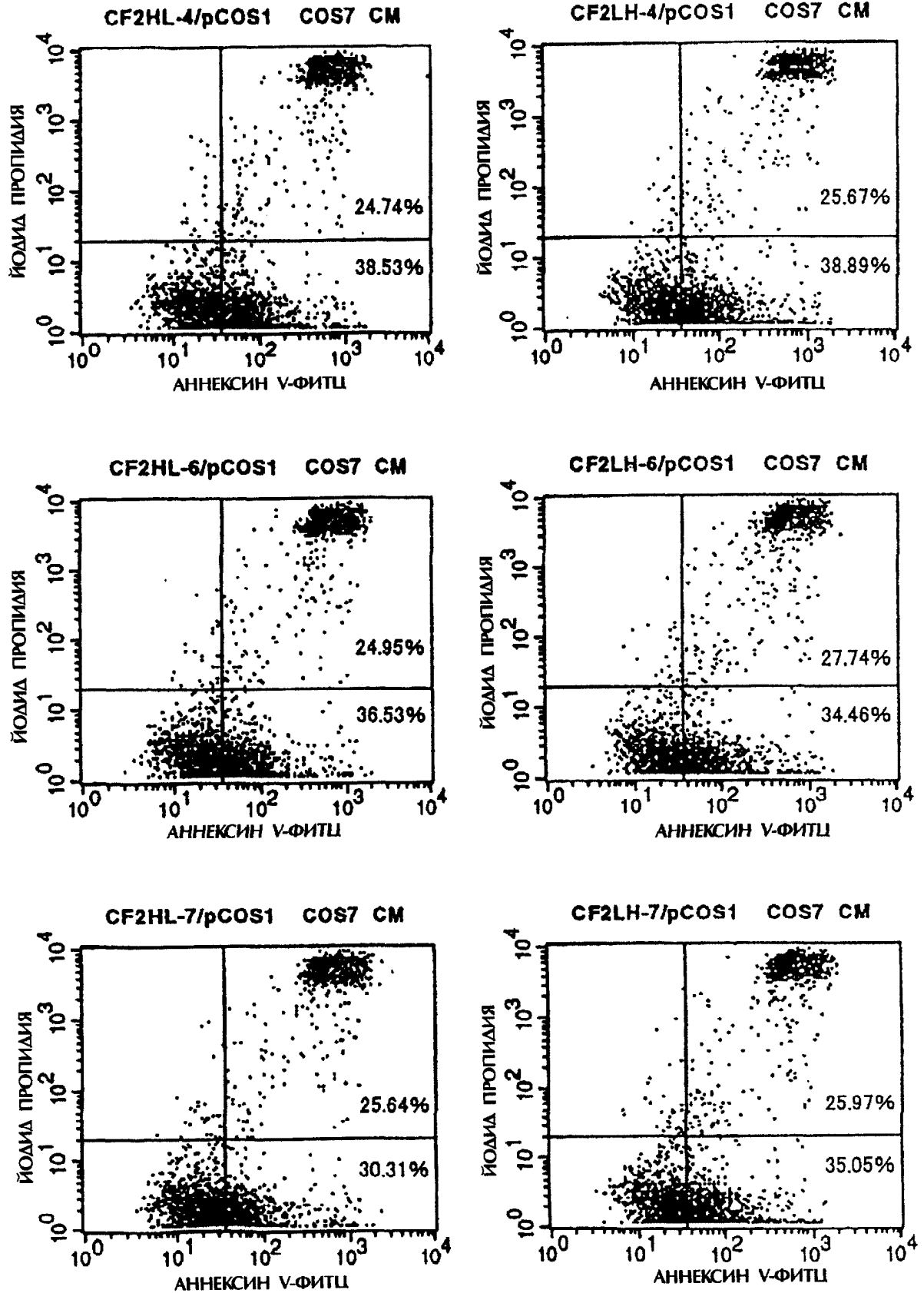


ФИГ. 40b





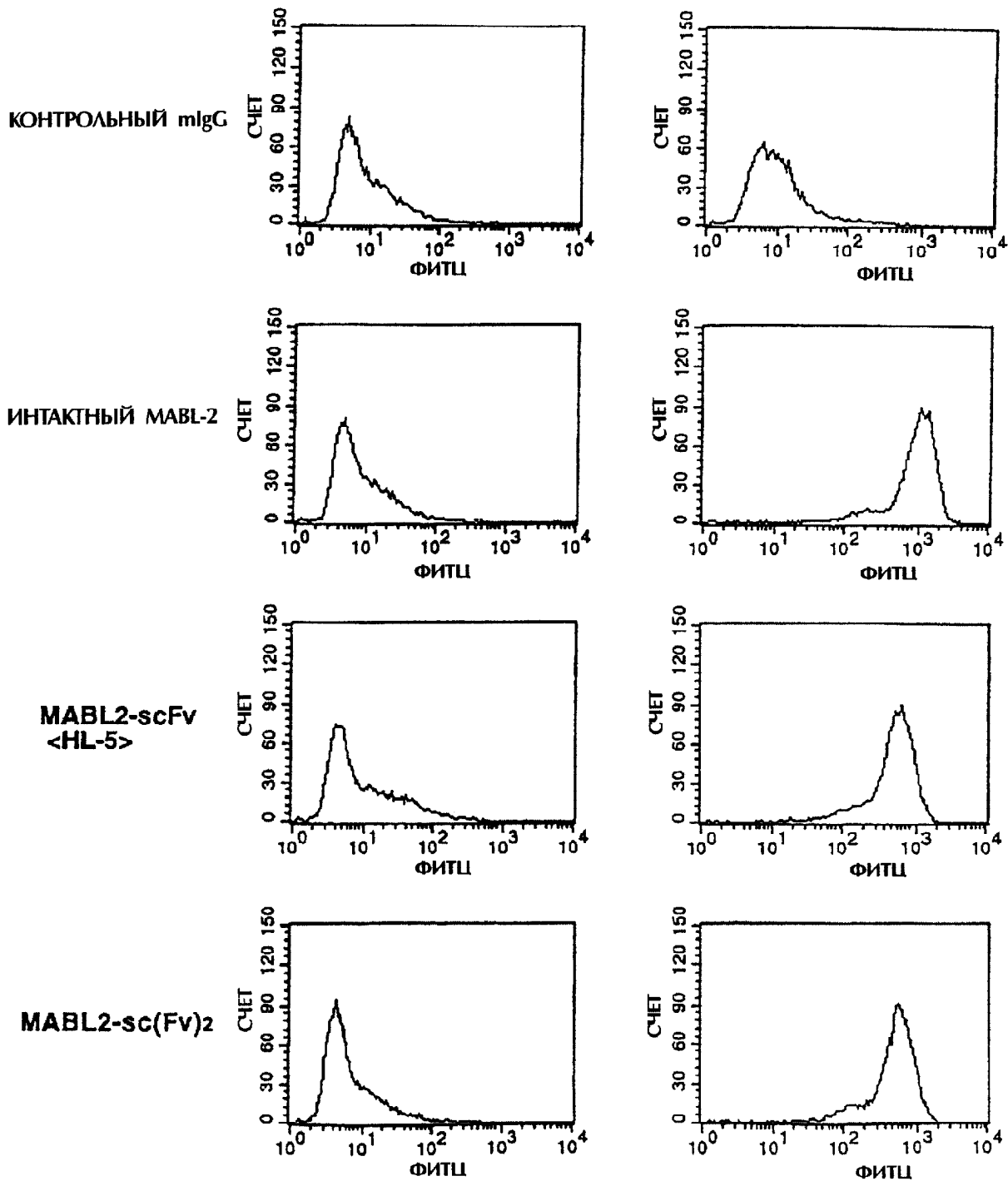
ФИГ. 41а



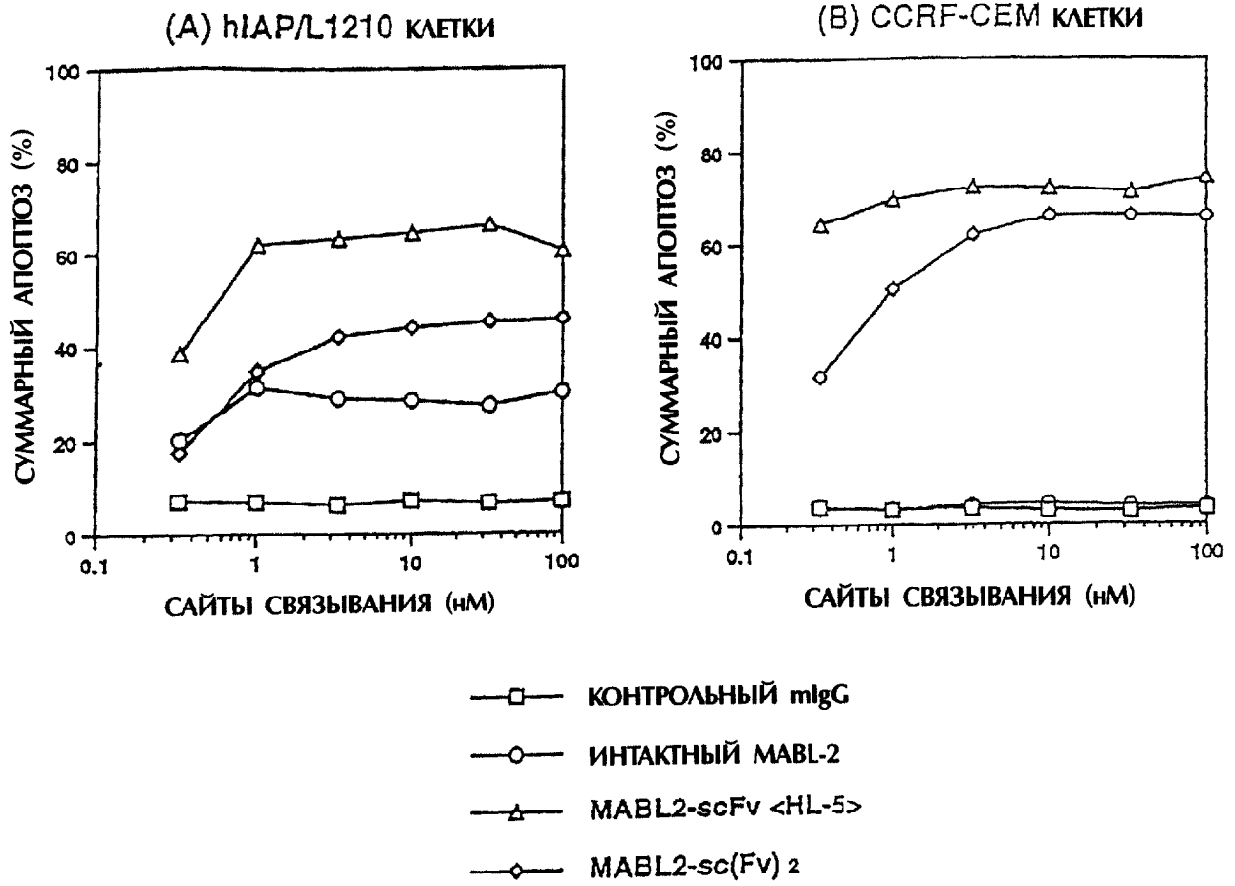
ФИГ. 41b

(A) pCOS1/L1210 КЛЕТКИ

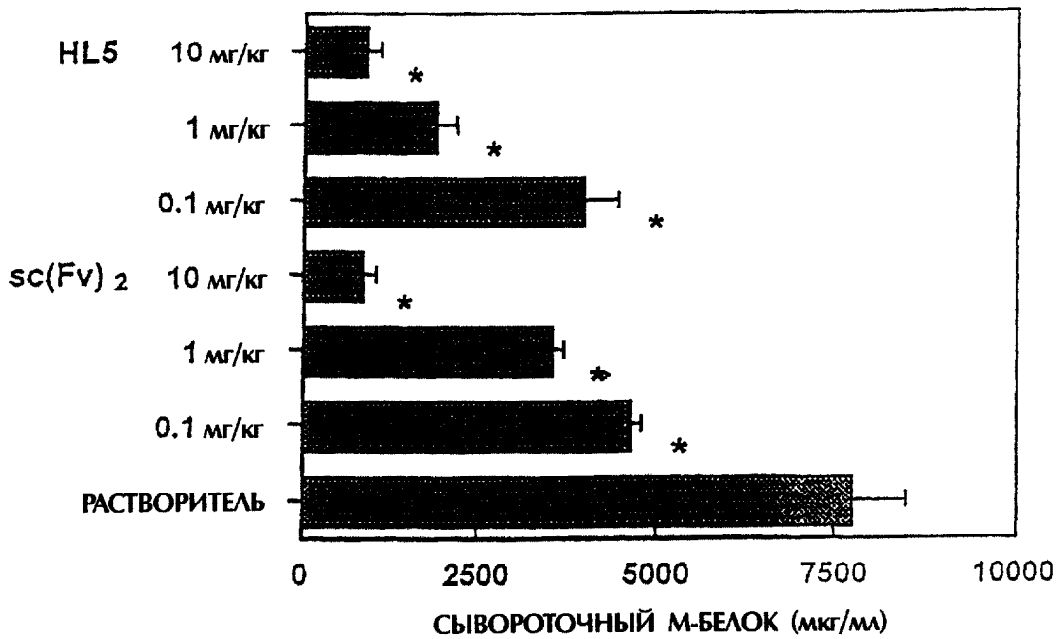
(B) hIAP/L1210 КЛЕТКИ



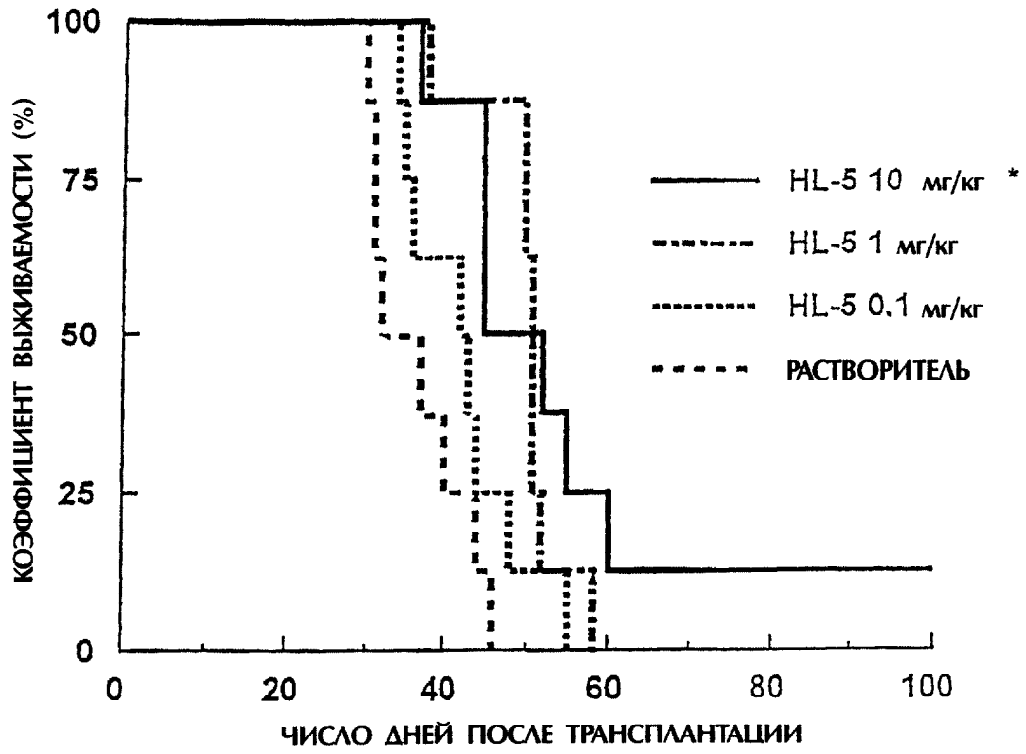
ФИГ. 42



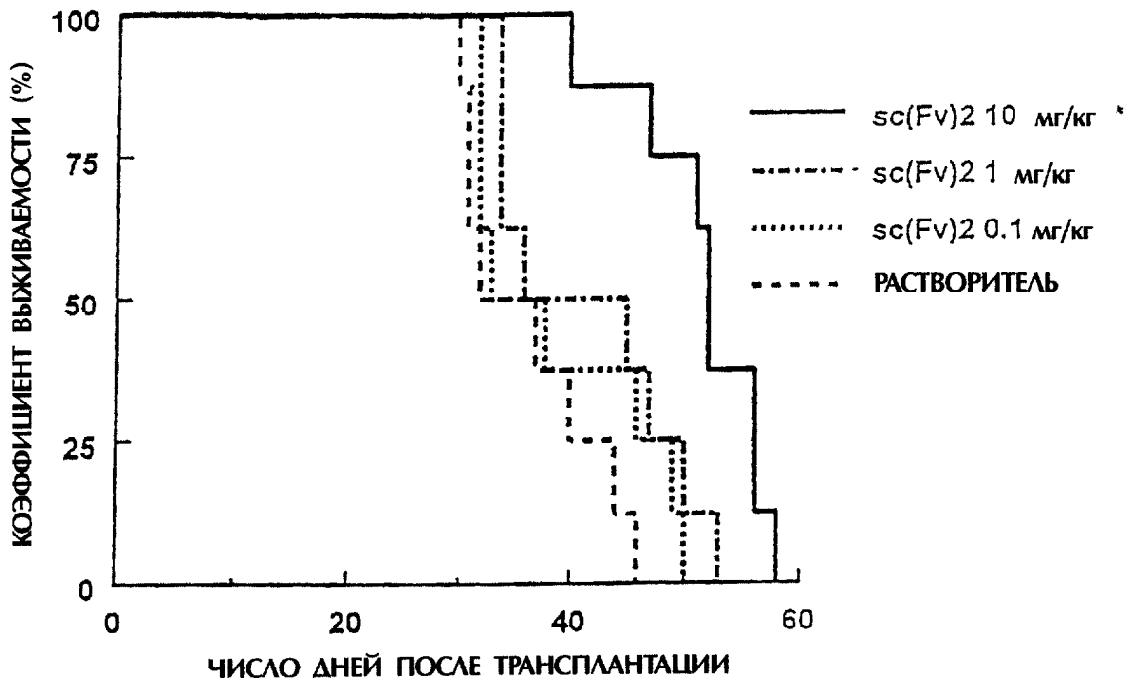
**ФИГ. 43**



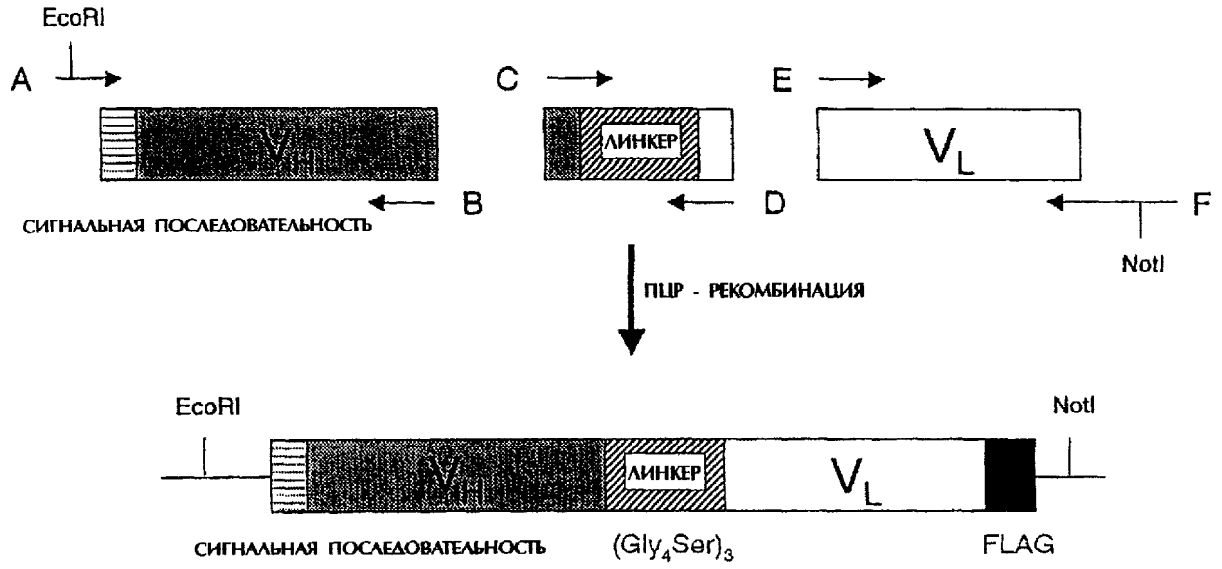
**ФИГ. 44**



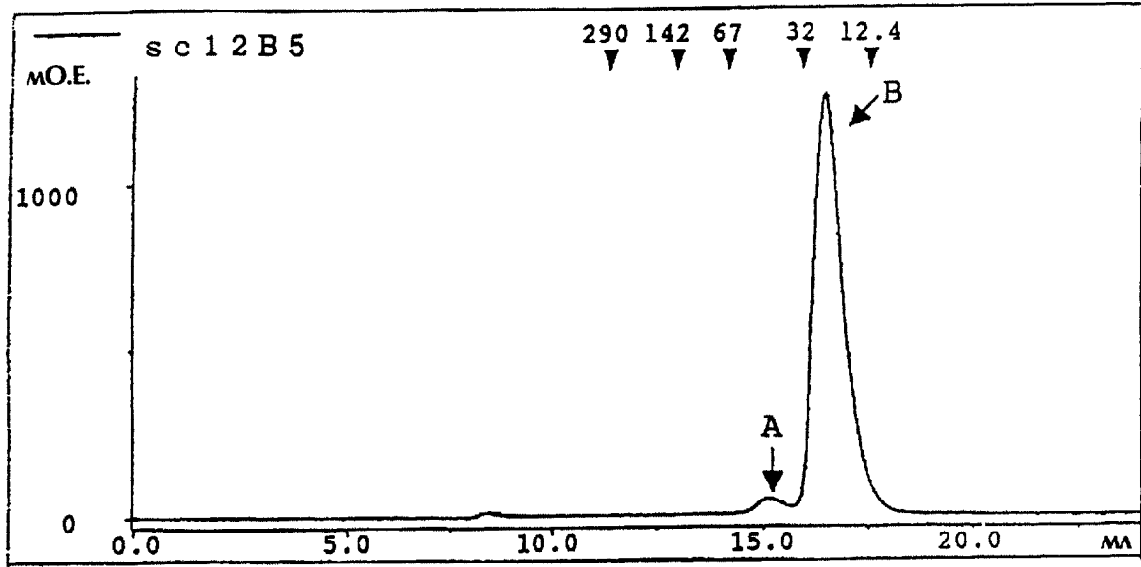
ФИГ. 45



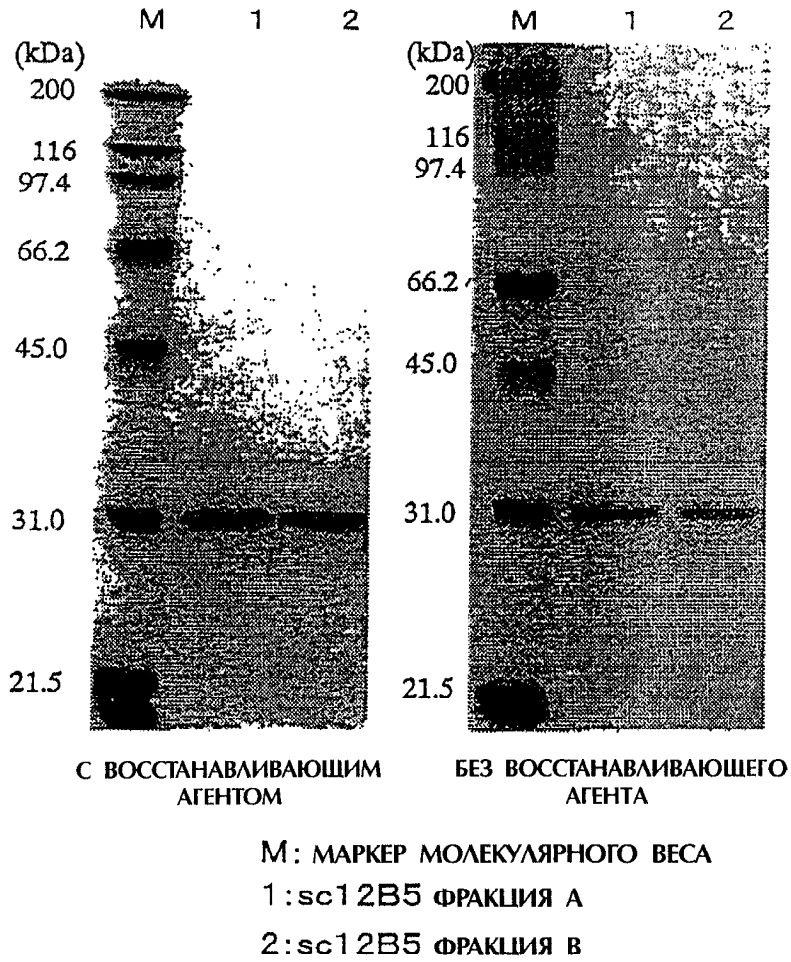
ФИГ. 46



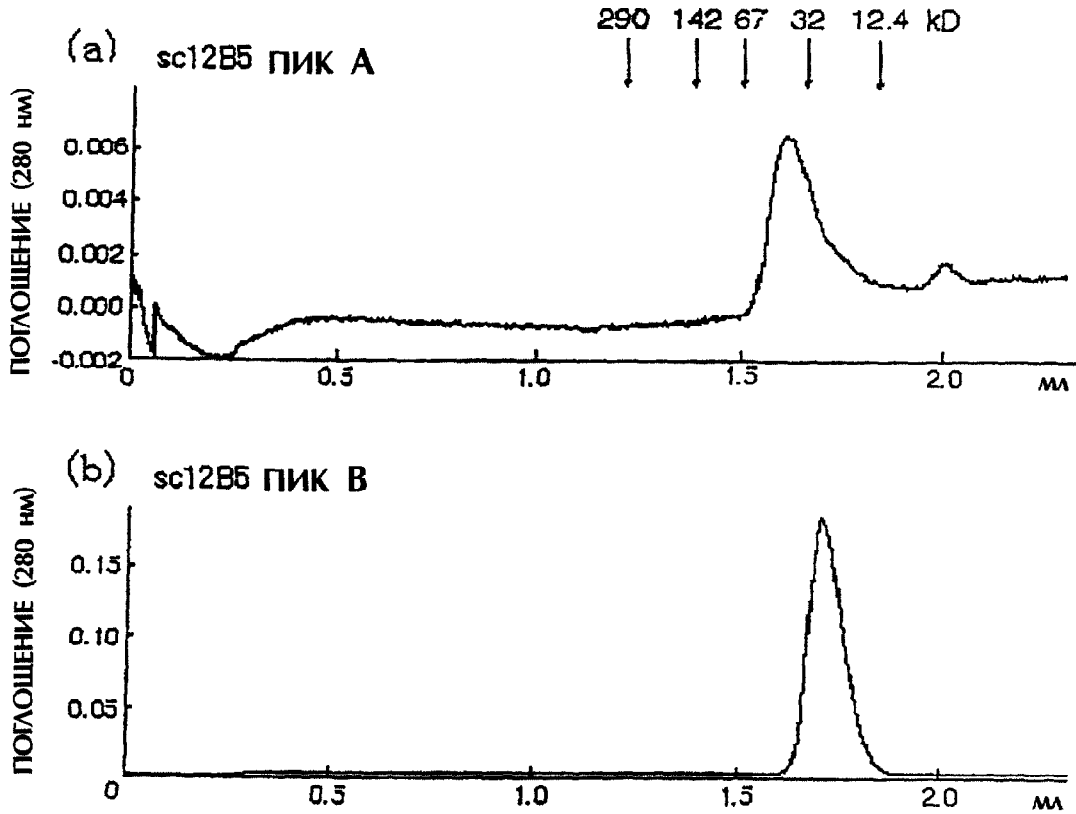
ФИГ. 47



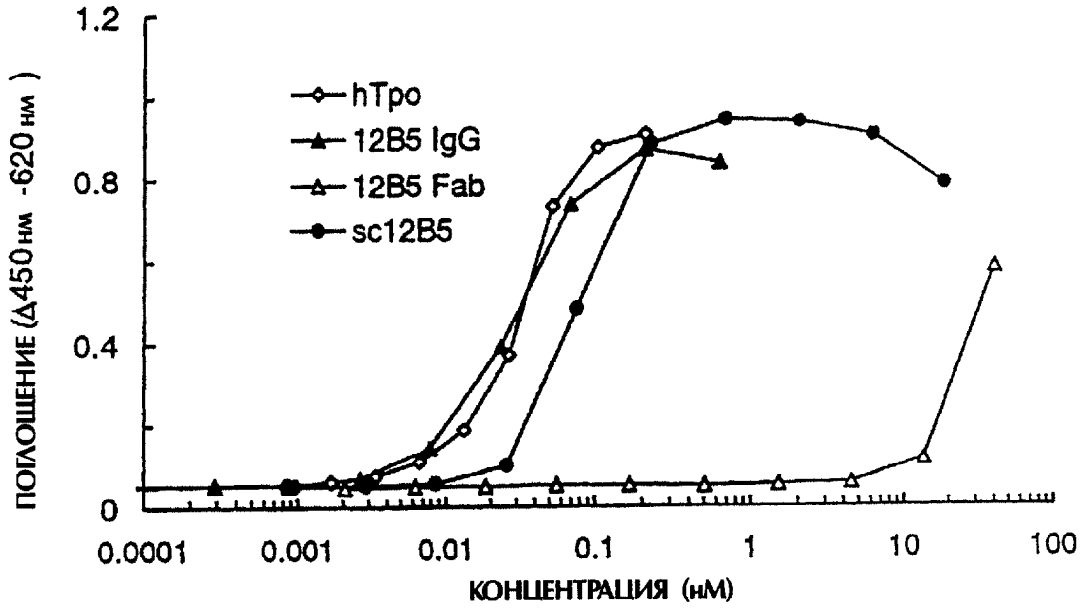
ФИГ. 48



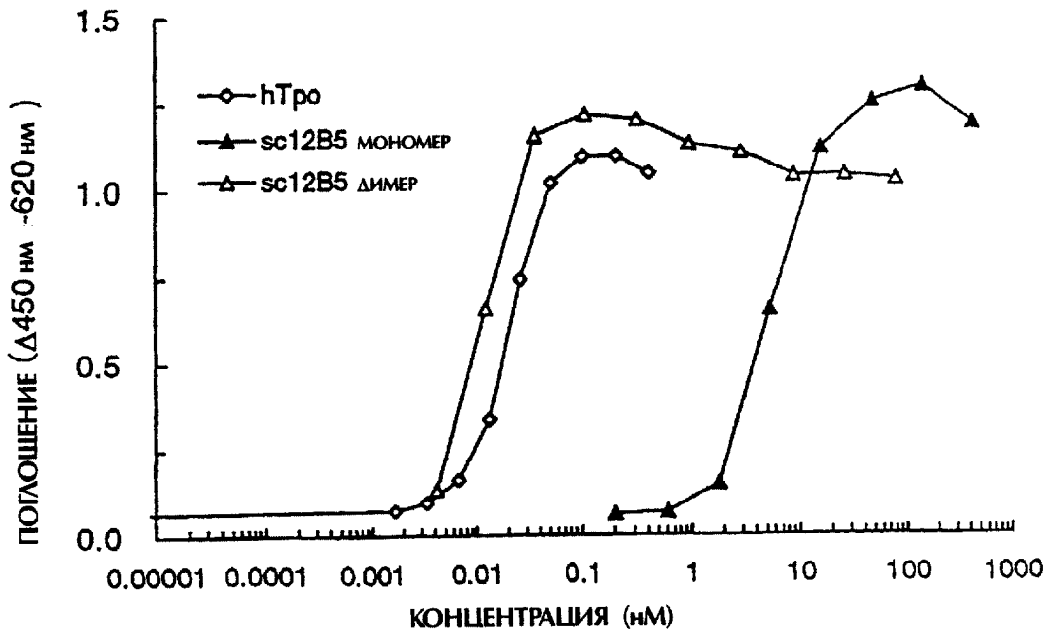
ФИГ. 49



ФИГ. 50

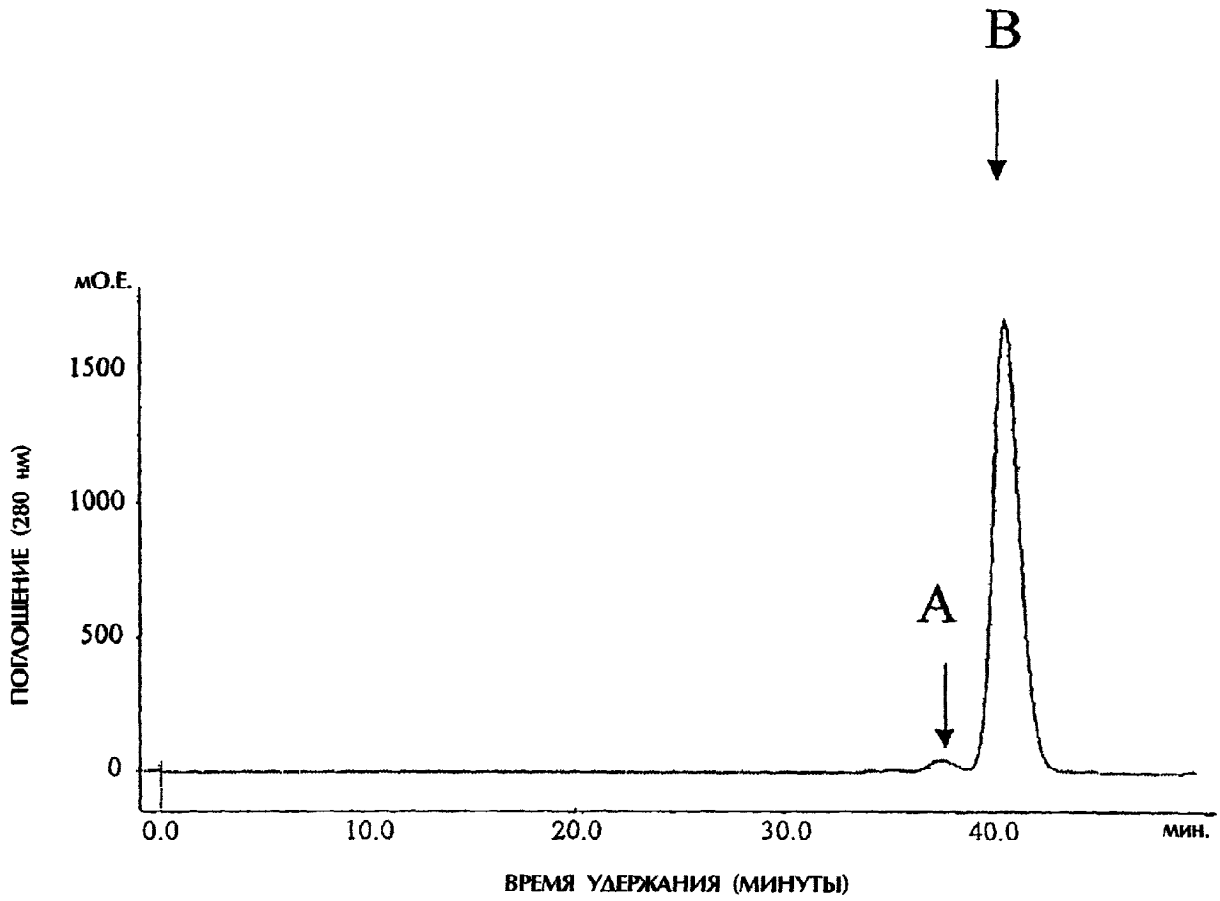


ФИГ. 51

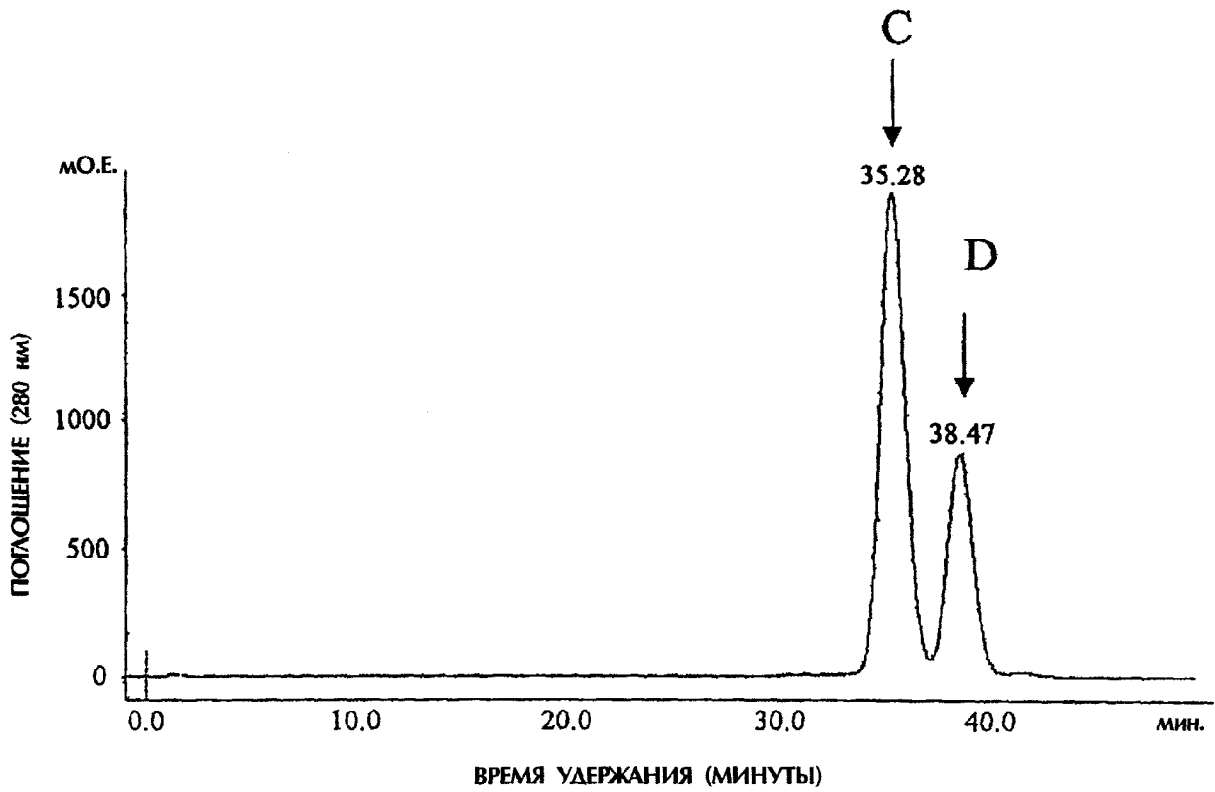


ФИГ. 52

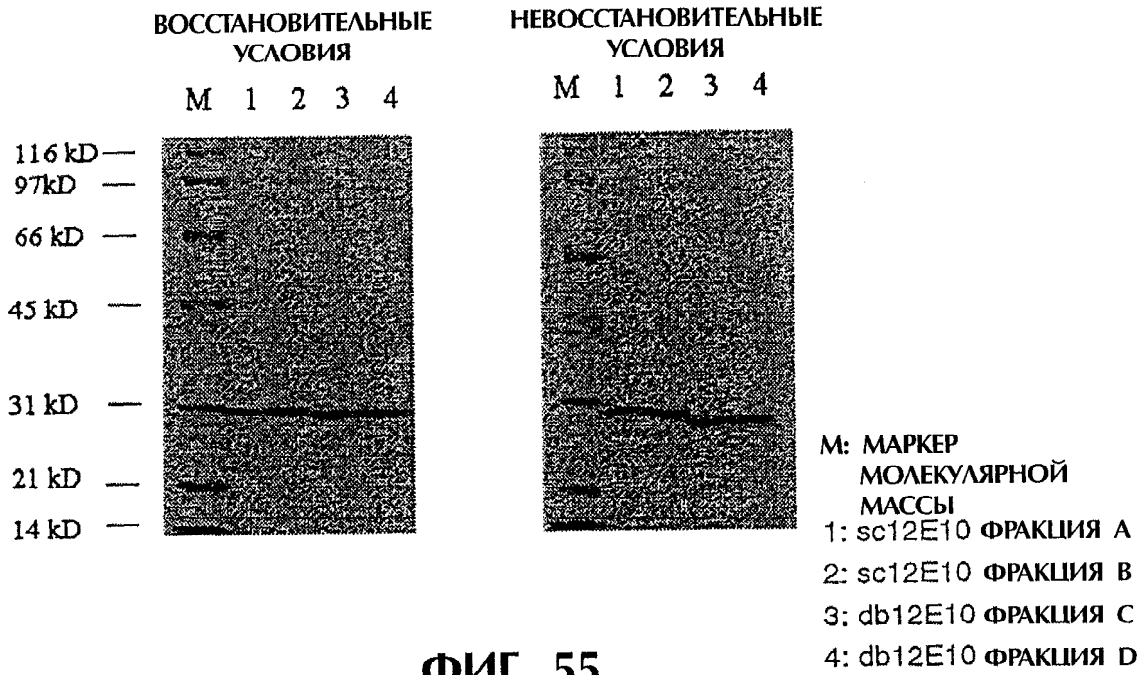




ФИГ. 53

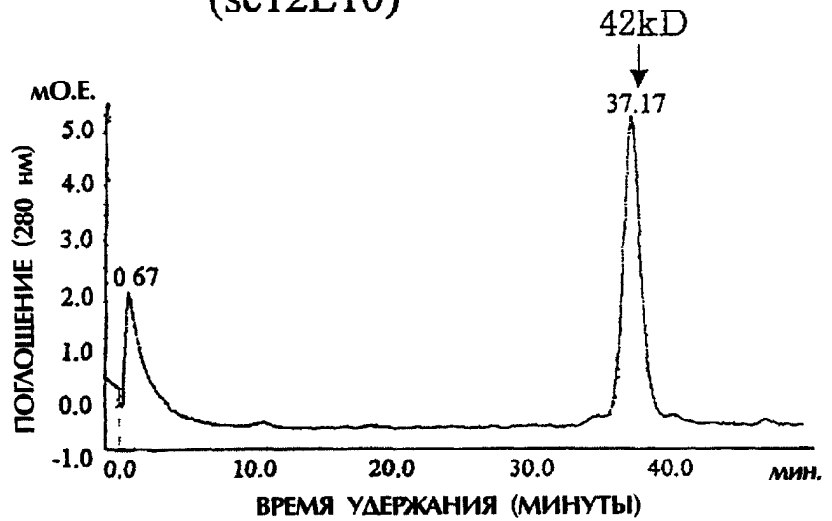


ФИГ. 54

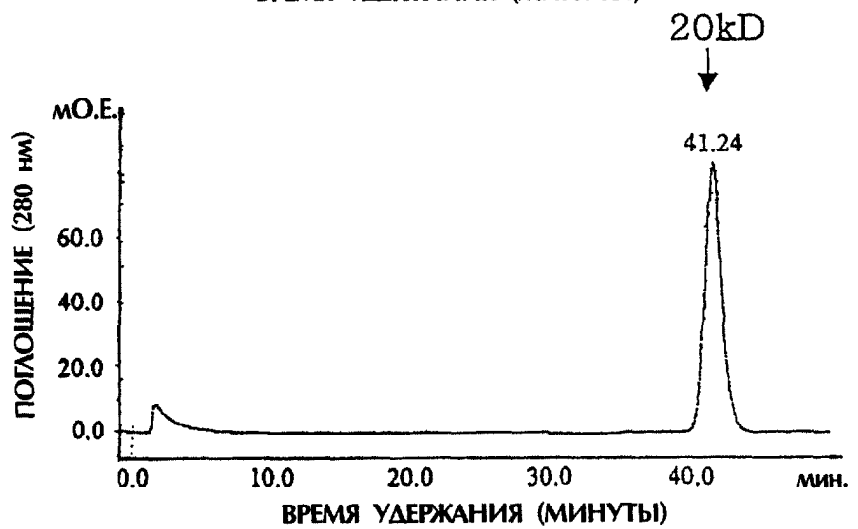


ФИГ. 55  
(sc12E10)

sc3 пик А



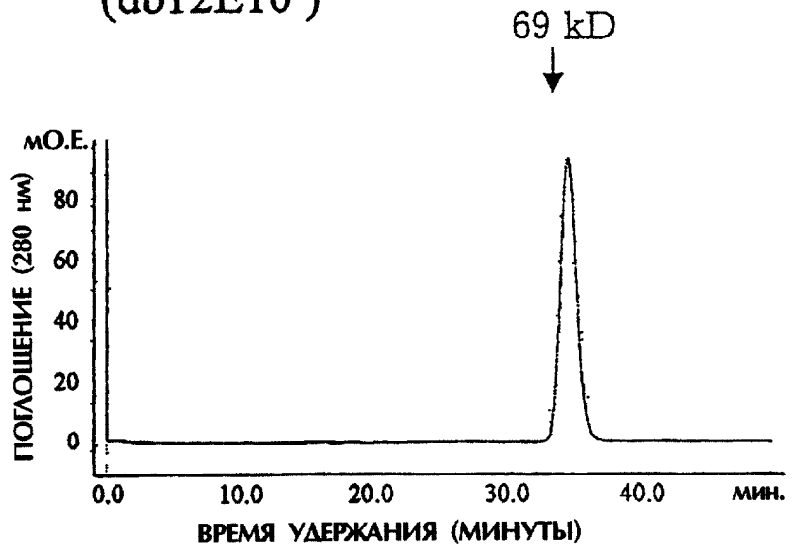
sc3 пик В



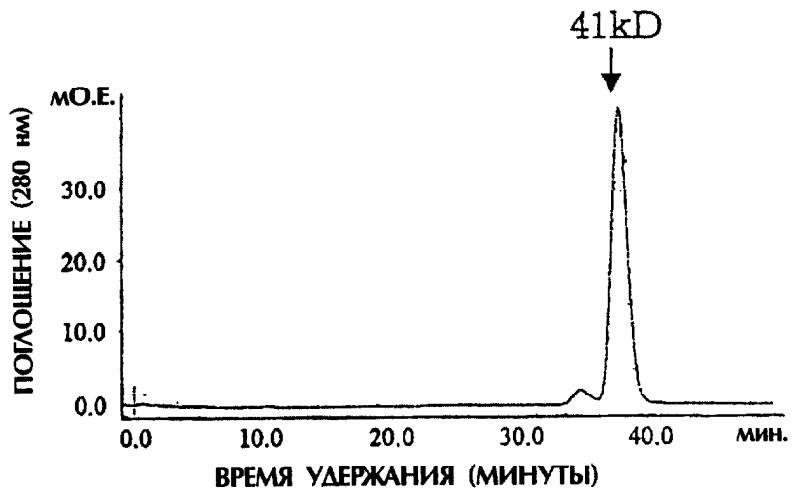
ФИГ. 56

(db12E10)

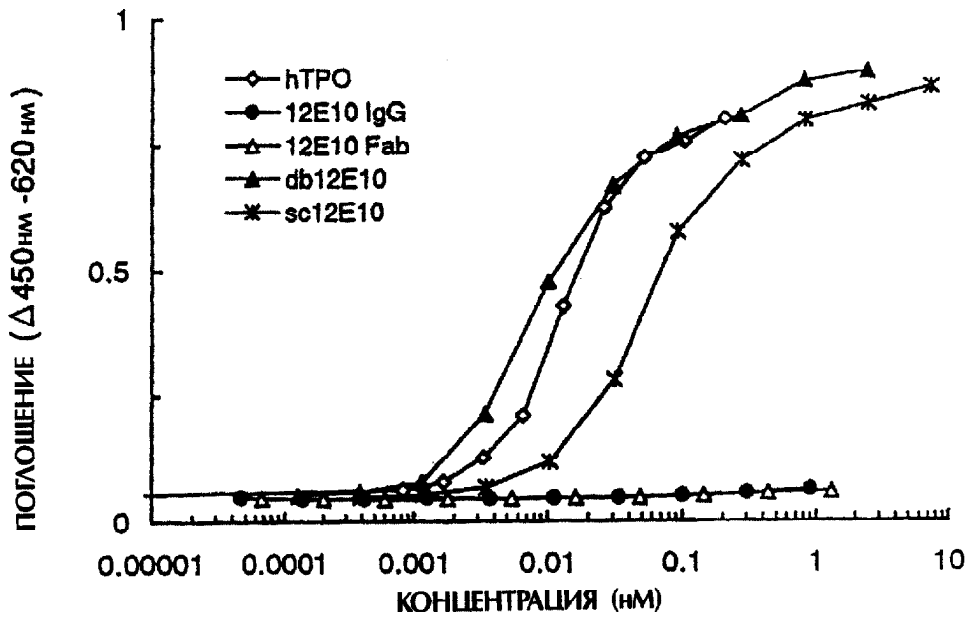
db3 пик С



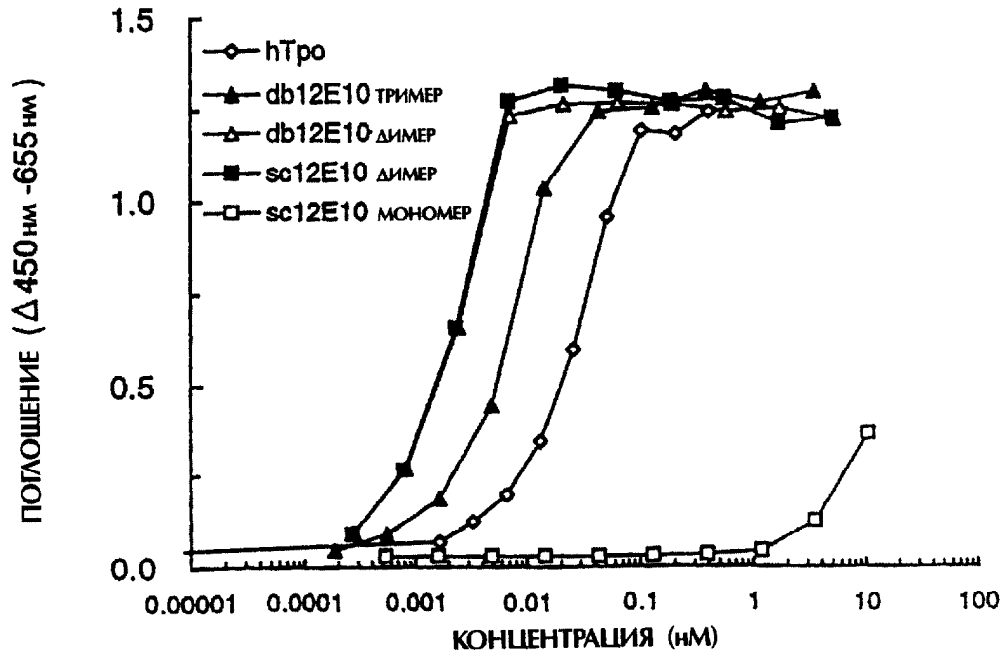
db3 пик D



ФИГ. 57



ФИГ. 58



ФИГ. 59