



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58482 (13) C2

(51) 7 C07K16/28, C12N5/20,

G01N33/577, A61K39/395, 49/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО VFF-18 ПРОТИ CD44V6 І ЙОГО ФРАГМЕНТИ

1

2

(21) 97010045

(22) 02 06 1995

(24) 15 08 2003

(86) PCT/EP95/02126, 02 06 1995

(31) P 44 19 913 9

(32) 08 06 1994

(33) DE

(31) P 44 31 297 0

(32) 02 09 1994

(33) DE

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р

(72) Адольф Гюнтер Р, DE, Патцельт Ерік, DE

(73) БЬОРИНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ІНТЕРНАЦІОНАЛЬ
ГМБХ, DE, ФОРШУНГСЦЕНТРУМ КАРЛЬСРУЕ
ГМБХ, DE

(56) M Salmi et al Regulated expression of exon v6
containing isoforms of CD44 in men. Downregulation
during Malignant Transformation of tumors of
squamous cell origin / J of Cell Biology, July 1993
New York, no 2, vol 122, p 431-442

D Jackson et al Expression of alternatively spliced
forms of the CD44 extracellular-matrix receptor on
human lung carcinomas / Intern J of Cancer, 1994
GENF, Schweiz, supplement 8, p 110-115

(57) 1 Моноклональне антитіло к епітопу с аміно-
кислотной последовательностью, кодируемой
варибельным экзоном v6 гена CD44, представ-
ляющее собой антитіло VFF-18, продуцируемое
гибридомой DSM ACC 2174, или его фрагмент,
сохраняющий его активность, причем монокло-
нальное антитіло или его фрагмент предназна-
чены для диагностических или терапевтических це-
лей

2 Антитіло по п 1, отличающееся тем, что оно
связано с другой молекулой, отличной от антите-
ла

3 Антитіло по п 2, отличающееся тем, что оно
связано с полипептидом

4 Антитіло по п 2, отличающееся тем, что оно
связано с токсином

5 Антитіло по любому из пп 2-4, отличающееся

тем, что оно связано с радиоактивным изотопом

6 Линия клеток гибридомы DSM ACC 2174, про-
дуцирующая моноклональное антитіло по п 1

7 Антитіло к епітопу с аминокислотной последо-
вательностью, кодируемой варибельным экзоном
v6 гена CD44, полученное рекомбинантной и/или
ферментативной и/или химической модификацией
без изменения аминокислотной последовательно-
сти антитіла VFF-18 в области места связывания
антигена, или его фрагмент, сохраняющий его
активность

8 Антитіло по п 7, отличающееся тем, что оно
связано с другой молекулой, отличной от антите-
ла

9 Антитіло по п 7, отличающееся тем, что оно
связано с полипептидом

10 Антитіло по п 7, отличающееся тем, что оно
связано с токсином

11 Антитіло по любому из пп 8-10, отличаю-
щееся тем, что оно связано с радиоактивным изо-
топом

12 Рекомбинантное антитіло к епітопу с аминो-
кислотной последовательностью, кодируемой ва-
рибельным экзоном v6 гена CD44, имеющее
идентичную аминокислотную последовательность
моноклонального антитіла VFF-18 в области мес-
та связывания антигена, или его фрагмент, сохра-
няющий его активность, причем рекомбинантное
антитіло или его фрагмент предназначены для
диагностических или терапевтических целей

13 Рекомбинантное антитіло по п 12, отличаю-
щееся тем, что оно представляет собой химер-
ную, гуманизированную одноцепочечную или по-
лученную путем сшивания цепей молекулу
антитіла

14 Рекомбинантное антитіло по п 12 или 13, от-
личающееся тем, что оно связано с другой моле-
кулой, отличной от антитіла

15 Рекомбинантное антитіло по п 14, отличаю-
щееся тем, что оно связано с полипептидом

16 Рекомбинантное антитіло по п 14, отличаю-
щееся тем, что оно связано с токсином

17 Рекомбинантное антитіло по любому из пп
14-16, отличающееся тем, что оно связано с ра-
диоактивным изотопом

(13) C2

(11) 58482

(19) UA

Изобретение относится к биологическим средствам для диагностических или терапевтических целей, более конкретно, к антителу VFF-18 и его аналогам

Недавно было показано, что экспрессия вариантов поверхностных гликопротеинов гена CD44 необходима и достаточна, чтобы вызвать так называемое спонтанное метастатическое поведение как в неметастазирующей линии клеток аденокарциномы поджелудочной железы крысы, так и в неметастазирующей линии клеток фибро-саркомы крысы (Günther и др., 1991). В то время, как наименьшая изоформа CD44, стандартная форма CD44s (или CD44std), выражается повсюду в ряду различных тканей, включая эпителиальные клетки, определенные сплайсинговые варианты CD44 (CD44v, CD44var) выражаются только в подгруппе эпителиальных клеток. Варианты CD44 получают путем альтернативного сплайсинга таким образом, что последовательности 10 экзонов (v1 - v10) в CD44s полностью вырезаются, однако, в большем числе вариантов могут наблюдаться в различных комбинациях (Screaton и др., 1992, Tolg и др., 1993, Hofmann и др., 1991). Варианты отличаются тем, что различные аминокислотные последовательности включаются в определенное положение внеклеточных участков белков. Такие варианты могли быть обнаружены в различных опухолевых клетках человека и опухолевых тканях человека. Так, недавно была исследована экспрессия вариантов CD44 при образовании и развитии колоректального ракового новообразования (Heider и др., 1993a). Экспрессия вариантов CD44 отсутствует в нормальном эпителии толстой кишки человека, и лишь слабая экспрессия наблюдается в пролиферирующих клетках крипт. На более поздних стадиях прогрессии опухоли, например, в случае аденокарцином, выражаются все злокачественные перерожденные варианты CD44. Экспрессия в ткани вариантов CD44 на высоком уровне могла быть также показана в случае агрессивных не-Ходжкинских лимфом (Коорман и др., 1993).

Показано, что важную роль, в особенности при метастатическом развитии, играет экзон v6 (Rudy и др., 1993). На модели животного антитела против специфичных к v6 эпитопов могли препятствовать распространению метастазирующих клеток и росту метастазов (Seiter и др., 1993). При карциномах толстого кишечника экспрессия v6 коррелирует с прогрессией опухоли (Wielenga и др., 1993). При раке желудка экспрессия v6 является важным диагностическим индикатором при дифференцировании опухолей интестинального и рассеянного типа (Heider и др., 1993b). Экспрессия v6 в обеих упомянутых последних работах была измерена с помощью антител против специфичных к v6 эпитопов.

Моноклональные антитела против эпитопа, кодируемые экзонem v6, известны из уровня техники (Hofmann и др., 1991, Wielenga и др., 1993). Из-за высокой потенциальной пользы, которую могут принести подобные антитела для диагностики и терапии, существует высокая потребность

в антителах с улучшенными свойствами.

Задачей настоящего изобретения является получение антител, которые по сравнению с известными специфичными к v6 антителам проявляют лучшие свойства.

Поставленная задача решается предлагаемым моноклональным антителом к эпитопу с аминокислотной последовательностью, кодируемой вариabельным экзонem v6 гена CD44, представляющим собой антитело VFF-18, продуцируемое гибридомой DSM ACC 2174, или его фрагмент, причем моноклональное антитело или его фрагмент предназначены для диагностических или терапевтических целей.

Дополнительным объектом изобретения является линия клеток гибридомы DSM ACC 2174, продуцирующей предлагаемое моноклональное антитело.

Дальнейшим объектом изобретения является антитело к эпитопу с аминокислотной последовательностью, кодируемой вариabельным экзонem v6 гена CD44, полученное рекомбинантной и/или ферментативной и/или химической модификацией без изменения аминокислотной последовательности антитела VFF-18 в области места связывания антигена, или его фрагмент.

Еще одним объектом изобретения является рекомбинантное антитело к эпитопу с аминокислотной последовательностью, кодируемой вариabельным экзонem v6 гена, имеющее идентичную аминокислотную последовательность моноклонального антитела VFF-18 в области места связывания антигена, или его фрагмент, причем рекомбинантное антитело или его фрагмент предназначены для диагностических или терапевтических целей.

Признаки, развывающие и уточняющие вышеприведенные объекты изобретения, описаны в нижеследующем.

Из полного иммуноглобулина антитела VFF-18 могут быть, например, получены фрагменты Fab или P(ab')₂ или другие фрагменты (Kreitman и др., 1993). Для диагностических способов можно соединять молекулы антитела VFF-18, их фрагменты или рекомбинантные молекулы антитела с одинаковым идиотипом, например, с радиоактивными изотопами, как ¹³¹I, ¹¹¹In, ^{99m}Tc или радиоактивными соединениями (Larson и др., 1991, Thomas и др., 1989, Srivastava, 1988), с ферментами, такими, как пероксидаза или щелочная фосфатаза (Catty и Raykundalia, 1989), с флуоресцентными красителями (Johnson, 1989) или с молекулами биотина (Guesdon и др., 1979). Для терапевтического применения можно соединять VFF-18 или производные от VFF-18 молекулы антитела с токсинами (Vitetta и др., 1991, Vitetta и Thorpe, 1991, Kreitman и др., 1993, Theuer и др., 1993), с цитостатиками (Schrappe и др., 1992), с пролекарствами (Wang и др., 1992, Senter и др., 1989) или с радиоактивными веществами. Антитело далее можно соединить с цитокином или другим иммуномодулирующим полипептидом, например, с фактором некроза опухоли или интерлейкином-2.

Далее специалист может получить после ана-

лиза аминокислотной последовательности антигена VFF-18 и/или при использовании линии клеток гибридомы, продуцирующей это антитело, и, в частности, содержащейся там генетической информации рекомбинантные молекулы антитела с таким же, как у VFF-18, идиотипом. Соответствующие способы составляют основу этой техники. Такие рекомбинантные молекулы антител могут быть, например, антителами, приближенными к таковым для человека (Shin и др., 1989, Gbssow и Seeman, 1991), биспецифическими антителами (Weiner и др., 1993, Goodwin, 1989), одноцепочечными антителами (scFv, Johnson и Bird, 1991), полными или фрагментарными иммуноглобулинами (Coloma и др., 1992, Nesbit и др., 1992, Barbas и др., 1992), или антителами, полученными путем сшивания цепей (Winter и др., 1994). Антитела, приближающиеся по составу к человеческим, могут, например, быть получены путем CDR-трансплантации (европейский патент 0239400). Также могут быть модифицированы каркасные участки (европейский патент 0519596). Для приближения к человеческим антителам сейчас могут быть использованы такие методы, как полимеразная цепная реакция (см., например, европейские патенты 0368684, 0438310, международная заявка 9207075) или компьютерное моделирование (см., например, международная заявка 9222653). Могут также быть получены составные белки, например, составные белки из одноцепочечного антитела и токсина (Chaudhary и др., 1990, Friedman и др., 1993). Такого рода молекулы антитела поэтому также включены в изобретение.

В пределах возможностей среднего специалиста находится также обнаружение точного эпитопа для VFF-18 и, располагая этими данными, получение эквивалентных антител с одинаковой специфичностью связывания. Это может происходить, например, при изучении связывания пептидов, как в примере 2, возможно с помощью разновидности пептида Hul. Поэтому подобные антитела также охватываются изобретением.

Диагностические способы при применении молекул антитела в соответствии с изобретением могут быть такими, как известные способы, например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) (Catty и Raykundalia, 1989), радиосимметричный анализ (Catty и Murphy, 1989), иммуногистохимические способы (Heider и др., 1993b) или Вестерн-блоты. Подобные способы целесообразно осуществлять с взятыми из тела пробами тканей или с жидкостями тела, например, при биопсии. Исследования могут проводиться качественно, полуколичественно или количественно. При этом могут быть использованы антитело или молекулы антитела, как, например, заложено в основе техники, описанной в международной заявке 9500851 для других специфичных к v6 антител, при этом полезные свойства антитела или молекул антитела согласно изобретению означают важное улучшение подобных способов.

Помимо диагностики *in vitro* молекулы антитела согласно изобретению годятся также для диагностики *in vivo*, особенно опухолей. Если молекула антитела имеет какую-нибудь детектируемую мет-

ку, можно использовать определение метки для диагностических целей, например, для визуального обнаружения опухоли *in vivo*, или, например, при хирургии с применением радиоактивных элементов. Для использования антител, конъюгированных с радиоактивными изотопами, для иммуно-сцинтиграфии существует, к примеру, ряд протоколов, на основании которых специалист может осуществить изобретение (Siccardi и др., 1989, Keenan и др., 1987, Perkins и Pimm, 1992, Colcher и др., 1987, Thompson и др., 1984).

Терапевтическое применение можно, например, проводить аналогично применению антитела 1 1 ASML (Seiter и др., 1993). При этом применение осуществляют системно или местно, например, путем внутривенной (разовое или капельное вливание), внутривисцеральной, внутримышечной, подкожной или других инъекций или вливаний. Можно также осуществлять перфузию в отдельные органы или участки. Представленные протоколы, касающиеся введения конъюгированных или неконъюгированных антител (будь это полные иммуноглобулины, фрагменты, рекомбинантные химерные молекулы и др.), являются уровнем техники (Mulshine и др., 1991, Larson и др., 1991, Vitetta и Thorpe, 1991, Vitetta и др., 1991, Breitz и др., 1992, Press и др., 1989, Weiner и др., 1989, Chatal и др., 1989, Sears и др., 1982).

Лучшие свойства VFF-18 по сравнению с другими антителами против CD44v6 показаны в примерах 2-4.

Рисунки

Фигура 1. Схема получения составного белка GST-CD44(v3-v10). GST означает глутатион-S-трансферазу *Schistosoma japonicum* v3 - v10 = варианты вставки цитокератина-CD44. Стрелкой отмечено место расщепления тромбином.

Фигура 2. Сравнение последовательностей экзона v6 гена CD44 у человека и крысы. Последовательности пептидов Ral и Hul, с которыми связываются антитела 1 1 ASML (против крысиного CD44v6) и VFF-18 (против человеческого CD44v6), выделяются жирно. Идентичные аминокислоты обозначены звездочкой.

Фигура 3. Связывание специфичных к CD44v6 антител с синтетическими пептидами. Связывание антител с пептидами определяли с применением ELISA-теста, при котором пептиды подвергали иммобилизации и затем инкубировали с растворами антител. После соответствующих этапов промывания обнаруживали антитело, связанное с конъюгированным с пероксидазой антителом против мышиного IgG (A). В первом эксперименте было доказано связывание специфичного к CD44v6 крысы антитела 1 1 ASML с пептидом Ral (KWFEN EWQKG NPPT) (B). В другом эксперименте был синтезирован гомологичный Ral пептид из последовательности человеческого CD44v6. Различные антитела из супернатантов гибридомы, полученной с использованием античеловеческого CD44v6, связывали с этим пептидом Hul (QWFGN RWHEG YRQT). При этом показано, что VFF-18 существенно лучше связывается с пептидом, чем остальные использованные антитела (B). Для количественной оценки этот эксперимент повторяли с использованием различных концентраций

очищенных антител. При этом также было обнаружено, что VFF-18 демонстрирует более высокое сродство к связыванию, чем другие антитела.

Фигура 4 Связывание радиоактивно меченых антител с опухолевыми клетками. Три антитела VFF-7 (анти-v6), VFF-8 (анти-v5) и HVFF-18 (анти-v6) метили радиоактивным N-гидроксисукцинимидным эфиром (2,3-³H]-пропионовой кислоты и использовали в опытах по связыванию с различными линиями опухолевых клеток. При этом были применены следующие линии клеток: CHO-CD44v_{ag} рекомбинантная линия клеток хомячка (яичник китайского хомячка), которая выражает на поверхности вариант человеческого CD44 (экзоны v3 – v10), HCF-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205 линии клеток карциномы толстой кишки человека, A431 линия клеток карциномы плоского эпителия человека. Показано специфическое связывание антител с различными линиями клеток. В то время, как связывание специфических к v6 антител VFF-7 и VFF-18 с рекомбинантной линией клеток CHO-CD44v_{ag} имеет одинаковый порядок величин, антитела ведут себя совершенно по-разному при связывании с линиями опухолевых клеток. В некоторых случаях наблюдается только связывание VFF-18 и в незначительной степени связывание VFF-8 (HT-29, CaCo, COLO 205), с другими линиями клеток VFF-18 связывается существенно лучше, чем VFF-7.

Фигура 5 Доказательство наличия растворимых вариантов CD44, содержащих экзон v6, в нормальной сыворотке человека. В сэндвич при ELISA-тесте помещались в качестве рабочих антител три специфических к v6 антитела VFF-4, VFF-7 и HVFF-18. Во всех трех случаях в качестве антигена-свидетеля использовали конъюгированное с пероксидазой специфичное к CD44std антитело (BU-52, std = стандарт). Обнаруживается сигнал от двух различных нормальных сывороток человека при различных разведениях в этих опытах ((А) и (Б)). В обоих случаях наблюдают существенно более сильный сигнал с VFF-18, чем с двумя другими антителами.

Фигура 6 Содержание в сыворотке вариантов CD44, содержащих v6. С помощью двух различных иммуноферментных анализов (ELISA-тест) было определено содержание растворимого CD44v_{ag} в сыворотке 6 здоровых доноров. В одном из опытов в качестве рабочего антитела применяют VFF-7, в другом применяют VFF-18, оба антитела узнают экзон v6. В качестве препарата сравнения в обоих случаях служил получаемый в CHO-клетках рекомбинантный растворимый вариант CD44 (экзон v3 – v10). ELISA-тест при использовании VFF-18 показывает в среднем в 3-5 раз более высокие значения, чем в случае VFF-7. Это означает, что имеющийся в сыворотке растворимый CD44v_{ag} лучше узнается антителом VFF-18, чем VFF-7.

Примеры Пример 1. Получение моноклональных антител VFF-18.

Клонирование составных протеинов в pGEX.

Общий отличающийся от стандартного участок CD44v типа НРКП (Hofmann и др., 1991) амплифицировали из человеческих цитокератинов кДНК с помощью полимеразной цепной реакции

(ПЦР). Обе ПЦР-затравки 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAATG-3', положения 25-52, и 5'-TGATAAGGAACGATTGACAITAGAGTTGGA-3', положения 1013-984 вариантного участка LCLC97, как описано Hofmann и др., содержали узнаваемый EcoR1 сайт рестрикции, который использовали, чтобы продукт ПЦР непосредственно клонировать в векторе pGEX-2T (Smith и др., 1988). Получающийся в результате продукт (pGEX CD44v НРКП, v3 – v10) кодирует составной белок с массой около 70 кД, состоящий из глутатион-S-трансферазы Schistosoma japonicum из экзона v3 – v10 человеческого CD44 (рис 1, Heidelegi др., 1993а). Составной белок выражался в E. coli, затем его очищали, используя сродство глутатиона к агарозе (Smith и др., 1988).

Иммунизация и скрининг.

Самки мышей линии Balb/c подвергали внутрибрюшинной иммунизации с помощью очищенного при аффинной хроматографии составного белка по следующей схеме.

1. Иммунизация. 90 мкг составного белка в полном адьюванте Фрейнда.

2 и 3. Иммунизация. 50 мкг составного белка в неполном адьюванте Фрейнда.

Иммунизации проводили с промежутками в 4 недели. Через 14 дней после последней иммунизации животных еще в течение трех последующих дней иммунизировали каждый раз 10 мкг составного белка в забуференном фосфатом физиологическом растворе поваренной соли. На следующий день клетки селезенки животного с высоким титром антител подвергали сплайну с миеломными клетками мыши P3 X63-Ag8 653 в полиэтиленгликоле 4000. Гибридомные клетки далее отбирали в планшеты для титрования на среде с гипоксантином, аминоптеринном и тимидином (Kohler и Milstein, 1975; Kearney и др., 1979).

Определение титра антител в сыворотке или скрининг гибридных супернатантов проводили с помощью ELISA-теста. При этом определении планшеты для титрования сначала покрывали составным белком (глутатион-S-трансфераза - CD44 v3 - 10) или только глутатион-S-трансферазой. Затем подвергали инкубированию с серийными разведениями сывороточных проб или гибридомными супернатантами и доказывали наличие специфических антител с конъюгированными с пероксидазой антителами против мышино-го иммуноглобулина. Гибридомы, реагирующие только с глутатион-S-трансферазой, были отвергнуты. Оставшиеся антитела прежде всего охарактеризовывали с помощью ELISA-теста со специфичными к домену составными белками (экзон v3, экзон v5 + v6, экзон v6 + v7, экзон v8 – v10) (Koorman и др., 1993). Их иммуногистохимическая реакционная способность была испытана на разрезах кожи человека. Антитело VFF-18 было затем идентифицировано по связыванию с синтетическим пептидом Hui (QWFGN RWHEG YRQT). Последовательность Hui является фрагментом экзона v6 человеческого CD44.

Пример 2 Связывание специфических к CD44v6 антител с синтетическими пептидами.

Связывание специфических к CD44 v6 антител

с синтетическими пептидами определяли с применением ELISA-теста

растворы

Рабочий бу- 0 05М карбонат натрия, pH 9 6

фер

Буфер для Забуференный фосфатом физиологический раствор поваренной соли (ЗФР) 0 5% бычий сывороточный альбумин (БСА) 0 05% Твин 20

Раствор суб- фирма Кьеркегаард & Perry Laboratories, Gaithersburg MD, США, 3,3',5,5'-тетраметилбензидиновый субстрат пероксидазы пероксидаз- ный раствор Б (H₂O₂) 1 1

Пептиды (50мкг/мл в рабочем буфере) подвергали иммобилизации на иммунопланшетах Максисорп фирмы НУНЦ (1 1 ASML) или планшетах Акти-А фирмы Байо Продактс (антитела VFF) при 4°C в течение ночи При использовании планшетов Акти-А пептид ковалентно связывается на планшете Затем промывали ЗФР / 0 05% Твином, на свободные адсорбирующие участки на поверхности планшетов наносили буфер для анализа (1 час при комнатной температуре) и снова промывали один раз ЗФР / 0 05% Твином 20 Планшеты Акти-А после нанесения буфера восстанавливали 10мм боргидридом натрия в 20мм бикарбонате натрия, pH 9 0 (встряхивали 1 час при комнатной температуре) и затем трижды промывали ЗФР / 0 05% Твином 20 Затем гибридные супернатанты или растворы антител в буфере для анализа в концентрациях между 0 02 и 10мкг/мл заливали в ячейки и инкубировали 2 часа при комнатной температуре в установке для встряхивания планшетов После этого сразу промывали трижды ЗФР / 0 05% Твином 20 Затем гибридные супернатанты или растворы антител в буфере для анализа в концентрациях между 0 02 и 10мкг/мл заливали в ячейки и инкубировали 2 часа при комнатной температуре в установке для встряхивания планшетов промывали трижды ЗФР / 0 05% Твином 20 и окрашивали раствором субстрата После обработки в течение 10 - 15 минут реакцию останавливали 2М серной кислотой и измеряли на фотометре поглощение при 450нм (от фона при 690нм)

В первом эксперименте было доказано связывание специфического к крысиному CD44 v6 антитела 1 1 ASML с пептидом Ral (KWFEN EWQGK NPPT) (Таблица 1, Рисунок 3 (А))

Таблица 1

1 1 ASML мкг/мл	Поглощение
10 00	1 652
5 00	1 702
2 50	1 658
1 25	1 595
0 63	1 502
0 31	1 211
0 16	0 971
0 08	0 686
0 04	0 458

0 02	0 270
------	-------

В другом опыте был синтезирован гомологичный Ral пептид из последовательности человеческого CD44v6 (Hul, QWFGN RWHEG YRQT) Различные антитела против человеческого CD44 v6 связывались с Hul При этом обнаруживается, что VFF-18 проявляет неожиданно более высокое сродство к связыванию, чем все другие добавленные антитела (Таблица 2, Рисунок 3 (Б))

Таблица 2

Антитело	Поглощение
VFF-2	0 067
VFF4	1 333
VFF-7	0 199
VFF-18	2 384

Кроме того, для количественной оценки очищенные антитела против человеческого CD44v6 подвергали связыванию в различных концентрациях с пептидом Hul При этом также отчетливо обнаруживается лучшее сродство к связыванию для VFF-18 в сравнении с другими антителами (Таблица 3, Рисунок 3 (В))

Таблица 3

мкг/мл Антитело	VFF4	VFF-7	VFF-18
10 000	1 225	0 247	2 320
3 333	1 404	0 226	2 550
1 111	0 853	0 094	2 483
0 370	0 336	0 054	2 426
0 123	0 163	0 028	1 354
0 041	0 086	0 025	0 615
0 014	0 048	0 021	0 268
0 005	0 036	0 031	0 095
0 002	0 021	0 021	0 061

Пример 3

Связывание радиоактивно меченых специфичных к CD44v6 антител с линиями опухолевых клеток

Введение радиоактивной метки в антитела N-гидроксисукцинимидный эфир [2,3-³H]-пропионовой кислоты с радиоактивностью 1мКи (Амерсхам, 1мКи/мл) быстро упаривали досуха в силиконизированном трубчатом пробнике при 0°C в вакууме от водоструйного насоса К остатку прибавляли 15мкг антитела (1 мг/мл в ЗФР, pH 7,4) и инкубировали в течение 48 часов при 4°C Затем избыток N-гидроксисукцинимидного эфира [2,3-³H]-пропионовой кислоты удаляли при реакции с 30мкл 1М глицина в ЗФР (20 минут при комнатной температуре) Отделение меченого антитела от [³H]-глицина осуществляли на колонке (объем 15мл) с Сефадексом-G-25-М, при этом в качестве растворителя использовали ЗФР / 0 5% БСА [³H]-меченое антитело появляется в конечном объеме Количество антител определяли при использовании ELISA-тест для детектирования мышиного иммуноглобулина и рассчитывали специфическую активность

Связывание меченых антител с опухолевыми клетками

Три антитела VFF-7 (анти-v6), VFF-8 (анти-v5) и VFF-18 (анти-v8) метили с помощью N-гидроксисукцинимидного эфира [2,3-³H]-пропионовой кислоты и использовали для опытов по связыванию с различными линиями опухолевых клеток. При этом применяли следующие линии клеток: CHO-CD44var, рекомбинантная линия клеток хомячка (яичник китайского хомячка), которая выражает на поверхности вариант человеческого CD44 (экзоны v3 - v10), HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205, линии клеток карциномы толстой кишки человека, A431, линия клеток карциномы плоского эпителия человека. Клетки помещали на планшеты для тканевых культур с 12 отверстиями, проводили инкубирование в течение ночи при 37°C в инкубаторе в углекислом газе, затем один раз промывали с помощью 3ФР и фиксировали спиртом (1 минуту при комнатной температуре). Затем промывали один раз культуральной средой (среда RPMI-1640 / 10% сыворотка эмбриона теленка) и связывали с радиоактивными антителами (250000 распадов в мин / ячейка в культуральной среде). После инкубации в течение 25 часов при комнатной температуре в устройстве для встряхивания планшетов трижды промывали 3ФР / 0.5% БСА, клетки растворяли в 0.1М едком натре / 1% тритоне X-100 и измеряли радиоактивность сцинтилляционным счетчиком. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 100-кратного избытка немеченого антитела. Связывание относили к определенному числу клеток (400000). После определения специфической активности антител количество связанных антител можно выразить в фмолях. Таблица 4 и Рисунок 4 демонстрируют специфическое связывание антител с различными линиями клеток. В то время, как связывание специфичных к v6 антител VFF-7 и VFF-18 с рекомбинантной линией клеток CHO-CD44var приблизительно одинаково, антитела ведут себя очень по-разному при связывании с линиями опухолевых клеток. В некоторых случаях наблюдают только связывание VFF-18, а связывание VFF-8 в незначительном объеме (HT-29, CaCo, COLO 205), в случае других линий клеток VFF-18 связывается значительно лучше, чем VFF-7.

Таблица 4

Линия клеток	VFF-7 фмоль	VFF-8 фмоль	VFF-18 фмоль
CHO-CD44var	33.50	68.42	46.52
HCT-116	L44	11.08	2022
CX-1	0.19	220	9.48
HT-29	0.00	2.60	26.07
CaCo	0.03	2.81	12.57
COLO 205	0.00	0.32	2.88
A431	8.19	42.32	38.73

Пример 4. ELISA-тест для определения растворимого CD44v6 в сыворотке

Растворы

Рабочий буфер 0.05 Мкарбонат натрия, pH 9.6

Буфер для анализа

Забуференный фосфатом физиологический раствор поваренной соли (3ФР) 0.5% бычий сывороточный альбумин (БСА) 0.05% Тайн 20 фирма Бендер Медсистемс для образцов Вена, Австрия фирма Киерке-Раствор суб-гаард & Perry Laboratories, Gaithersburg MD, США, 3,3',5,5'-тетрамилбензидиновый субстрат пероксидазы пероксидазный раствор Б (H₂O₂) 1:1

На планшеты для титрования (фирма Нунц, иммунопланшеты Максисорп F96) наносили специфичное к CD44 v6 антитело в концентрации 5мкг/мл (инкубирование при 4°C в течение ночи). Затем промывали 3ФР / 0.05% Твином, на свободные адсорбирующие участки на поверхности планшетов наносили буфер для анализа (1 час при комнатной температуре) и снова промывали один раз 3ФР / 0.05% Твином 20. Пробы сыворотки затем предварительно разбавляли, по меньшей мере, в отношении 1:5 растворителем для образцов и далее делали серийные разведения (1:2) в планшете растворителем для образцов. Затем 50мкл / ячейка конъюгированного с пероксидазой хрена антитела против CD44std (клон BU-52, Сайт связывания, Бирмингем) прибавляли в подходящем разведении (1:3000 - 1:10000) в буфере для анализа. После трехчасового инкубирования при комнатной температуре в устройстве для встряхивания планшетов трижды промывали 3ФР / 0.05% Твином 20 и окрашивали раствором субстрата. После обработки в течение 10-15 минут реакцию останавливали с помощью 2М серной кислоты и измеряли на фотометре поглощение при 450 нм (от фона при 690нм).

Для количественной оценки делали серийное разведение в буфере для анализа растворимого стандартного препарата CD44 параллельно с пробами сыворотки. Этот препарат был выделен в чистом виде из надосадочной жидкости от рекомбинантных клеток хомячка (CHO), которые выражают растворимый CD44 v3 - v10. В случае CD44 v3 - v10 речь идет о человеческом варианте CD44, который содержит кодируемые экзонами от v3 до v10 пептидные последовательности.

Таблица 5 и Рисунок 5 показывают наличие в нормальной сыворотке человека растворимых вариантов CD44, содержащих экзон v6. При ELISA-тесте с применением техники сэндвича использовали три специфичных к v6 антитела VFF4, VFF-7 или VFF-18 в качестве рабочих антител. Во всех трех случаях применяли в качестве антитела для идентификации конъюгированное с пероксидазой антитело, специфичное к CD44 -стандарту (BU-52). В этих опытах обнаружился сигнал от двух разных нормальных сывороток человека при различных разведениях. В обоих случаях ((А) и (Б)) с VTF-18 можно наблюдать существенно более сильный сигнал, чем с двумя другими антителами.

Таблица 5А

Сыворотка 1

Разведение	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1 5	0 406	0 417	3 143
1 10	0 378	0 289	3 055
1 20	0 296	0 179	1630
1 40	0 207	0 072	1 778
1 80	0 109	0 062	1 084
1 160	0 050	0 030	0 594
1 320	0 026	0 008	0 318
1 640	0 012	0 007	0 159

Таблица 5 Б

Сыворотка 2

Разведение	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1 5	1 690	1 280	3 290
1 10	1 756	1,185	3 321
1 20	1 564	0 857	3 163
1 40	1 213	0 468	3 050
1 80	0 699	0 208	2 537
1 160	0 336	0 061	1 666
1 320	0 138	0 014	0 988
1 640	0 054	0 018	0 546

В Таблице 6 и на Фигуре 6 представлены значения концентраций в сыворотке вариантов CD44, содержащих v6. В двух различных опытах с использованием ELISA-теста было определено содержание растворимого CD44var в сыворотках 6 здоровых доноров. В одном опыте использовали VFF-7, в другом использовали VFF-18 в качестве рабочего антитела, оба антитела узнают экзон v6. Препаратом сравнения служил в обоих случаях полученный в CHO-клетках рекомбинантный растворимый вариант CD44 (экзон v3 – v10). ELISA-тест при использовании VFF-18 показывает в среднем в 3,5 раза более высокие значения, чем аналогичный анализ с VFF-7. Это означает, что встречающийся в сыворотке растворимый CD44var по сравнению с рекомбинантным белком узнается лучше антителом VFF-18, чем антителом VFF-7.

Таблица 6

Донор	VFF-7 нг/мл	VFF-18 нг/мл	VFF- 18/VFF-7
1	182	75 9	4 17
2	32 1	85 5	2 66
3	22 4	87 6	3 91
4	27 7	91 6	3 31
5	26 8	98 3	3 67
6	95 4	332	3 48
среднее значение			3 53
стандартное отклонение			0 52
относительное стандартное отклонение %			14 9%

Литература

Barbas C F, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones T M, Zebedee S L, Persson M A A, Nara P L, Norrby E, Burton D R. Рекомбинантные фрагменты Fab человека нейтрализуют In vitro вирус иммунодефицита человека типа 1. Proc Natl Acad Sci U S A 89 9339-9343 (1992)

Breitz H B, Weiden P L, Vanderheyden J-L, Appelbaum J W, Bjorn M J, Fer M F, Wolf S B, Ratcliff B A, Seiler C A, Foisie D C, Fisher D R, Schroff R W, Fritzberg A R, Abrams P G. Клинический опыт с мечеными рением-186 моноклональными антителами для радиоиммунотерапии: результаты испытаний в I фазе / Nud Med 33 1099-1112 (1992)

Catty, D, Raykundalia, C. ELISA и родственные иммуноанализы. В Catty, D (редактор) Антитела. Том II. IRL Press Oxford (1989), 97-152, с 105-109

Catty, D, Murphy, G. Иммуноанализы с использованием радиоактивных меток. В Catty, D (редактор) Антитела. Том II. IRL Press Oxford (1989), 77-96

Chatal J-F, Saccavini J-C, Gestin J-F, Tiedrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibe D, Fumoleau P, Guillard Y. Биораспределение меченого индием-111 моноклонального антитела OC 125, введенного внутривенно больным, оперированным по поводу карцином яичников. Cancer Res 49 3087-3094 (1989)

Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. Быстрый метод клонирования генов функционального вариативного участка антитела в Escherichia coli в качестве одноцепочечных иммунотоксинов. Proc Natl Acad Sci U S A 87 1066 (1990)

Colcher D, Esteban J, Carrasquillo J A, Sugarbaker P, Reynolds J C, Bryant G, Larson S M, Schlom J. Комплементация внутривенного и внутривенного введения моноклонального антитела (B72 3) больным раком. Cancer Res 47 4218-4224 (1987)

Coloma M J, Hastings A, Wims L A, Morrison S L. Новые векторы для экспрессии молекул антител, использующие вариативные участки, генерированные полимеразной цепной реакцией. Y Immunol Methods 152 89-104 (1992)

Friedraan P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chase D, Trial P A, Brown J P, Siegall C B. BR96 sFv-PE40, сильнодействующий одноцепочечный иммунотоксин, который селективно убивает клетки карциномы. Oncol Res 53 334-339 (1993)

Goodwill D A. Новый подход к проблеме нацеливания специфических моноклональных антител на опухоли человека, использующий антигеновые выходы антитела. / Nud Med 51 645 (1989)

GfInthert, U, Hofmann, M, Rudy, W, Reber, S, Zdenher, M, Hausmann, I, Matzku, S, Wenzel, A, Ponta, H и Herrlich, P. Новый вариант CD44, включающий гликопротеин, придает метастатический потенциал клеткам карциномы крысы. Cell 65 13-24 (1991)

Guesdon, J I, Teraynick, T, Avrameas, S. J. Histochem Cytochem, 27 1131 (1979)

Gusbow D, Seeman G. Приближение моноклональных антител по составу к человеческим. Methods Enzymol 203 99-121 (1991)

Heider, K-H, Hofmann, M, Horst, E, van den Berg, F, Ponta, H, Herrlich, P и Pals, S T Человеческий гомолог крысиного, связанного с метастазом варианта CD44 экспрессируется в колоректальных карциномах и кистозных полипах J Cdl Biol 120 227-233 (1993a)

Heider, K-H, Dammrich, J, Skroch-Angel, P, Muller-Hermelink, H-K, Vollmers, H, Herrlich, P и Ponta, H Дифференциальная экспрессия сплайсинговых вариантов CD44 при карциномах желудка человека интестинального и рассеянного типа и при нормальной слизистой оболочке желудка Cancer Res 53 4197-4203 (1993b)

Hofmann, M, Rudy, W, Zfiller, M, Tolg, C, Ponta, H, Herrlich, P, и Gunthert, U Сплайсинговые варианты CD44 способствуют метастатическому действию у крыс гомологические последовательности экспрессируются в линиях опухолевых клеток человека Cancer Res 51 5292-5297 (1991)

Johnson, G D Иммунофлуоресценция В Catty, D (редактор) Антитела Том II IRL Press Oxford (1989), 179-200 с 180-189

Johnson S, Bird R E Создание одноцепочечных производных моноклональных антител и их продуцирование в Escherichia coli Methods Enzymol 203 88-98 (1991)

Kearney, J F, Radbruch A, Liesegang B, Rajewski K Новая линия клеток мышины мислоны, которая утратила экспрессию иммуноглобулина, но позволяет создать линии гибридных клеток, секретирующих антитела J Immunol 123 1548 (1979)

Keenan A M, Weinstein J N, Carrasquillo J A, Bunn P A, Reynolds J C, Foon K A и др Иммунолимфосцинтиграфия идозовая зависимость меченного ¹¹¹In моноклонального антитела T101 у больных с Т-клеточной лимфомой кожи Cancer Res 47 6093-6099 (1987)

Kohler, G, Milstein, C Непрерывное культивирование слитых клеток, выделяющих антитело предопределенной специфичности Nature 255 495 (1975)

Koopman, G, Heider, K-H, Horts, E, Adolf, G R, van den Berg, F, Ponta, H, Herrlich, P, Pals, S T Активированные лимфоциты человека и агрессивные не-Ходжкинские лимфомы экспрессируют гомолог крысиного, связанного с метастазом варианта CD44 J Exp Med 177 897-904 (1993)

Kreitman R J, Hansen H J, Jones A L, FitzGerald D J P, Goldenberg D M, Pastan L Иммунотоксины, основанные на экзотоксине Pseudomonas, содержащие антитело LL2 или LL2~Fab', индуцируют регрессию кожной человеческой В-клеточной лимфомы у мышей Cancer Res 53 819-825 (1993)

Larson S M, Cheung N-K V, Leibel S A Радиоактивные конъюгаты В DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (редактор) Биологическая терапия рака J B Lippincott Cotr, Филадельфия, 496-511 (1991)

Mulshine J L, Magnani J L, Linnoila R I Применение моноклональных антител в лечении солидных опухолей В DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (редактор) Биологическая терапия рака J B Lippincott Cotr, Филадельфия, 563-588 (1991)

Nesbit M, Fu Z F, McDonald-Smith J, Steplewski Z, Curtis P J Производство функционального моноклонального антитела, узнающего клетки колоректальной карциномы человека из бакуповирусной экспресс-ионной системы J Immunol Methods 151 201-208 (1992) Perkins A C, Pimm M V Роль гамма-сцинтиграфии в иммунологии и иммунотерапии рака Eur J Nucl Med 19 1054-1063 (1992)

Press O W, Eary J F, Badger C C, Martin P J, Appelbaum F R, Levy R, Miller R, Brown S, Nelp W B, Krohn K A, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas E D, Bernstein I D Лечение резидентной не-Ходжкинской лимфомы радиоактивно меченым антителом MB-1 (анти-CD37) J Clin Oncol 7 1027-1038 (1989)

Rudy, W, Hofmann, M, Schwartz-Albiez, R, Zoller, M, Heider, K-H, Ponta, FL, Herrlich, P Два главных белка гена CD44, экспрессируемых на метастатической линии опухолевых клеток крысы, являются производными различных сплайсинговых вариантов каждый в отдельности достаточен для передачи метастатического действия Cancer Res 53 1262-1268 (1993)

Schrappe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppel G A, Markowitz D D, Muelier B M, Reisfeld R A Длительное подавление роста ксенотрансплантатов глиомы человека хеомимунконъюгатами 4-дезацетилвинбластин-3-карбоксигидразида и моноклонального антитела 91 27 Cancer Res 52 3838-3844 (1992)

Screaton, G B, Bell, M V, Jackson, D G, Cornells, F B, Gerth, U и Bell, J I Геномная структура ДНК, кодирующая лимфоцитарный хоминговый рецептор CD44, обнаруживает, по крайней мере, 12 экзонов как результат 24 альтернативного сплайсинга Proc Natl Acad Sci USA 89 12160-12164 (1992)

Sears H F, Mattis J, Herlyn D, Hayry P, Atkinson B, Ernst C, Steplewski Z, Koprowski H I фаза клинического испытания моноклонального антитела в лечении опухолей желудочнокишечного тракта Lancet 1982 (i) 762-765 (1982)

Seiter, S, Arch, R, Reber, S, Komitowski, D, Hofmann, M, Ponta, H, Herrlich, P, Matzku, S, Zoller, M Предупреждение образования метастазов опухоли с помощью анти-вариантного CD44, J Exp Med 177 443455 (1993)

Senter P D, Schreiber G J, Hirschberg D L, Ashe S A, Hellstrom K E, Hellstrom I Повышение in vitro и in vivo противоопухолевой активности фосфорилированного митомицина С и производных этопозида с помощью конъюгатов моноклонального антитела с щелочной фосфатазой Cancer Res 49 5789-5792 (1989)

Shin S-U, Morrison S L Получение и свойства химерных молекул антител Methods Enzymol 178 459476 (1989)

Siccardi A G, Buraggi G L, Callegaro L, Colella A C, DeFilippi P G и др Иммуносцинтиграфия аденокарцином с помощью радиоактивно меченых фрагментов F(ab')₂ моноклонального антитела против карциозембрионального антигена многоцентровое исследование Cancer Res 49 3095-3103 (1989)

Smith, D B, Johnson, K S Одностадийная очи-

стка полипептидов, экспрессированных в *Escherichia coli* в виде соединений с глутатион-S-трансферазой Gene 67 31-40 (1988)

Srivastava S C (редактор) Радиоактивно меченые моноклональные антитела для визуального обнаружения и терапии Life Sciences Series A 152 Plenum Нью-Йорк (1988)

Tolg, C, Hofmann, M, Herrlich, P и Ponta, H Выбор сплайсинга из 10 вариантных экзонов доказывает изменчивость CD44 Nucleic Acids Res 21 1225-1229(1993)

Theuer C P, Kreitman R J, FitzGerald D J, Pastan I Иммунотоксины приготовленные с рекомбинантин формой экзотоксина A из *pseudomonas*, которые не нуждаются в прогелизации для проявления активности Cancer Res 53 340-347 (1993)

Thomas G D, Dykes P W, Bradwell A R Антитела для иммунодетектирования опухоли и методы введения радиоактивной метки в антитела В Catty D (редактор) Антитела IRL Press Oxford, 223-244 (1989)

Thompson C H, Stacker S A, Salehi N, Lichtenstein M, Leyden M J, Andrews J T Иммуноцитография для определения метастазов в лимфатические узлы в результате рака молочной железы Lancet 1994 (2) 1245-1247 (1984)

Vitetta E S, Thorpe P E Иммунотоксины В DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (редактор)

Биологическая терапия рака J B Lippincott Сотр, Филадельфия, 482-495 (1991)

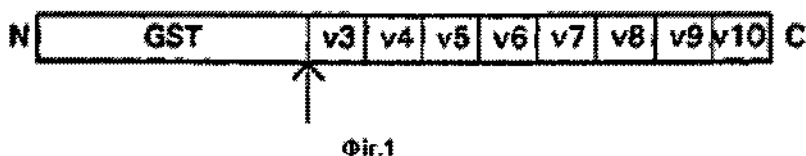
Vitetta E S, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D, Ghetie V, Uhr JW, Thorpe P E I фаза испытания иммунотоксина у больных с В-клеточной лимфомой Cancer Res 51 4052-4058(1991)

Wang S-M, Chera J-W, Yeh M-Y, Ng J C, Tung E, Roffler S R Специфическое активирование по-оксидных пролекарств для терапии рака конъюгатами антитело - фермент-мишень Cancer Res 52 4484-4491 (1992)

Weiner L M, O'Dwyer J, Kitson J, Comis R L, Frankel A E, Bauer R J, Koprad M S, Groves E S I фаза оценки действия против рака молочной железы цепочечного иммуноконъюгата моноклонального антитела 260F9 с рекомбинантным рибонуклеазом A Cancer Res 49 4062-4067 (1989)

Wierenga, V J M, Heider, K-H, Offerhaus, G J A, Adolf, G R, van den Berg, F M, Ponta, H, Herrlich, P, Pals, S T Экспрессия белков варианта CD44 при колоректальном раке человека связана с прогрессией опухоли Corner Res 53 4754-4756 (1993)

Winter, G, Griffith, A D, Hawkins, R E, Hoogenboom, H R Приготовление антител с помощью фаз воспроизводящей технологии Ann Rev Immunol 12,433-455 (1994)



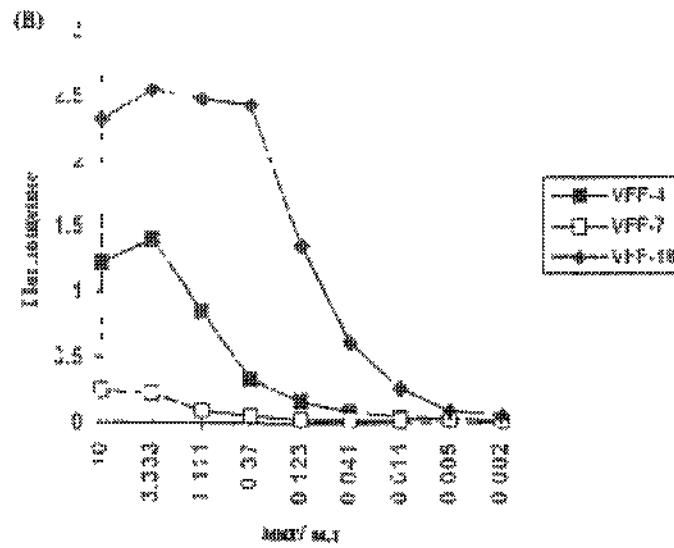
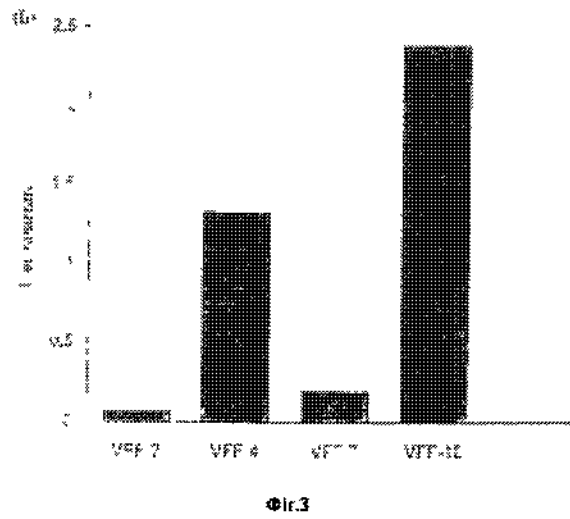
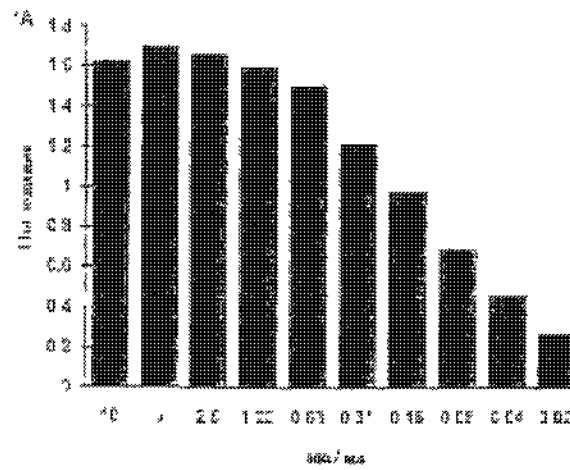
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Крыса : WADPNSTTERRAATQKEKNFENWQGNPPTPSEDSHVTEGT T

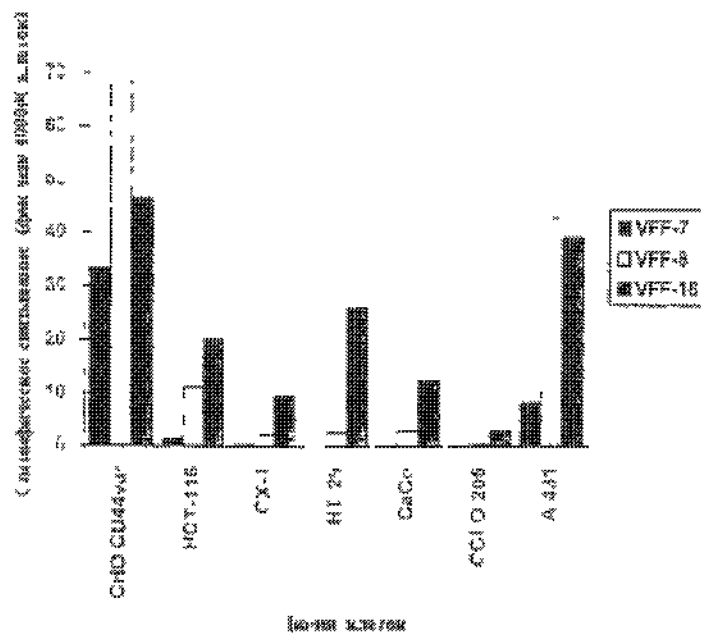
Человек : QATFSSTTTEETATQKEQWFGNRNHEGYRQTFREDSHSTGTAA

Пептид Ral или Hui

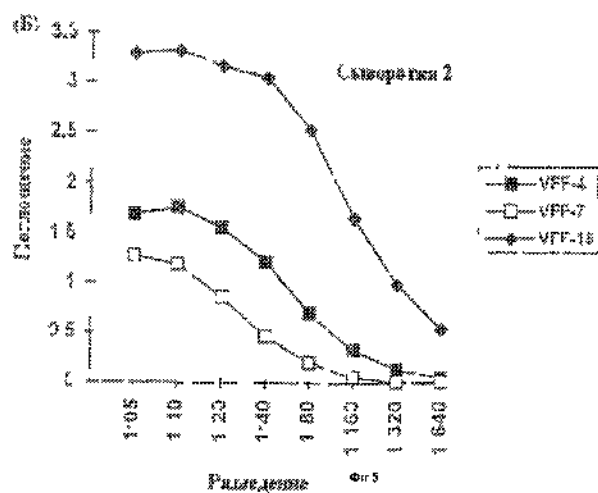
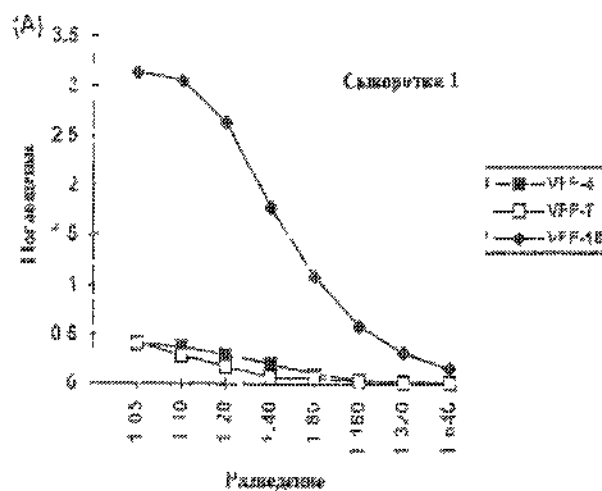
Фир.2



Фиг.3
(продолж
ения)



Фиг. 4



Фиг. 5

