



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61065 (13) C2
(51) 7 A61K39/395, A61P35/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПЛОСКОКЛІТИННОГО РАКУ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ

1

(21) 98073540
(22) 05 12 1996
(24) 17 11 2003
(86) PCT/EP96/05448, 05 12 1996
(31) 195 45 472 3
(32) 06 12 1995
(33) DE
(31) 196 15 074 4
(32) 17 04 1996
(33) DE
(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.
(72) Хайдер Карп-Хайнц, DE, Адольф Гюнтер, DE, Остерманн Елінборг, DE, Патцельт Ерік, DE, Шпролль Марліз, DE
(73) БЬОРИНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ІНТЕРНАЦІОНАЛЬ ГМБХ, DE, ФОРШУНГСЦЕНТРУМ КАРЛСТРУЕ ГМБХ, DE
(56) WO 95/33771 A 05 01 1995,
WO 95/00851 A 05 01 1995,
DE 4326573 A 23 02 1995,
Brooks et al The expression of variant CD44 in nasopharyngeal carcinoma is unrelated to expression of LMP-1 // American Journal of Pathology, vol 146, no 5, May 1995, p 1102-1112
(57) 1 Засіб для лікування плоскоклітинного раку, що містить активну сполуку, який відрізняється тим, що як активну сполуку він містить ефективну кількість антитіла або молекули антитіла, яке (яка) зв'язується на амінокислотній послідовності WFGNRWHEGYR
2 Засіб за п. 1, який відрізняється тим, що як антитіло або молекулу антитіла він містить моноклональне антитіло BWA-1 (VFF-18), яке одержують від лінії клітин гібридоми, що депонована під №DSM ACC2174, або похідне цього антитіла
3 Засіб за одним з пп. 1 або 2, який відрізняється тим, що як антитіло або молекулу антитіла він містить моноклональне антитіло, Fab- або F(ab')₂-фрагмент імуноглобуліну, рекомбінантно одержане антитіло, рекомбінантно одержане химерне або

2

гуманізоване антитіло, біфункціональне антитіло або однокланцюгове похідне антитіла (scFv)
4 Засіб за одним з пп. 1-3, який відрізняється тим, що він містить антитіло або молекулу антитіла, яке (яка) зв'язується з радіоактивним ізотопом, сполукою, що фотоактивується, радіоактивною сполукою, ферментом, флуоресцентним барвником, молекулою біотину, токсином, цитостатиком, проліками, молекулою антитіла з іншою специфічністю, цитокином або іншим імуномодуючим поліпептидом
5 Спосіб лікування плоскоклітинного раку, що базується на зв'язуванні молекули антитіла на епітопі, який кодується варіабельним екзоном v6 гена CD44, який відрізняється тим, що використовують антитіло або молекулу антитіла, що впізнає амінокислотну послідовність WFGNRWHEGYR
6 Спосіб за п. 5, який відрізняється тим, що як антитіло або молекулу антитіла використовують моноклональне антитіло BWA-1 (VFF-18), яке одержують від лінії клітин гібридоми, що депонована під №DSM ACC2174, або похідне цього антитіла
7 Спосіб за одним з пп. 5 або 6, який відрізняється тим, що як антитіло або молекулу антитіла використовують моноклональне антитіло, Fab- та F(ab')₂-фрагмент імуноглобуліну, рекомбінантно одержане антитіло, рекомбінантно одержане химерне або гуманізоване антитіло, біфункціональне антитіло або однокланцюгове похідне антитіла (scFv)
8 Спосіб за одним з пп. 5-7, який відрізняється тим, що використовують антитіло або молекулу антитіла, яке (яку) сполучають з радіоактивним ізотопом, сполукою, що фотоактивується, радіоактивною сполукою, ферментом, флуоресцентним барвником, молекулою біотину, токсином, цитостатиком, проліками, молекулою антитіла з іншою специфічністю, цитокином або іншим імуномодуючим поліпептидом

(13) C2
(11) 61065
(19) UA

Винахід стосується способу діагностики і лікування плоскоклітинного раку, що базується на експресії варіабельного екзона v6 гена CD44, засобу для здійснення такого способу, а також його застосування.

Недавно було показано, що експресія варіантів глікопротеїну поверхні CD44 необхідна і достатня для того, щоб викликати так звану спонтанну метастатичну поведінку не тільки в неметастазуючій лінії клітин аденокарциноми підшлункової залози щура, але також у неметастазуючій лінії клітин фібросаркоми щура (Gunthert і ін., 1991). У той час, як найменша ізоформа CD44, стандартна форма CD44s, повсюдно експресується в ряду різних тканин, у тому числі епітеліальних клітин, певні варіанти сплайсингу CD44 (CD44v) експресуються тільки на підгрупі епітеліальних клітин. Ізоформи CD44 так виробляються через альтернативний сплайсинг, що послідовності 10 екзонів (v1-v10) у CD44s цілком вирізаються, однак, при великих варіантах можуть існувати в різних комбінаціях (Screaton і ін., 1992, Heider і ін., 1993, Hofmann і ін., 1991). Варіанти розрізняються тим, що у певне положення позаклітинної частини білка вбудовуються різні амінокислоти послідовності.

Такі варіанти можна було виявити в різних пухлинних клітинах людини й у тканині пухлини людини. Так, недавно була досліджена експресія варіантів CD44 у ході колоректального канцерогенезу (Heider і ін., 1993). Експресія варіантів CD44 недостатня в нормальному епітелії товстої кишки людини, і лише слабка експресія виявляється в проліферуючих клітинах крипт. На пізніх стадіях прогресування пухлини, наприклад, у випадку аденокарциноми, експресуються всі зловиясні перероджені варіанти CD44. Далі, недавно була показана експресія сплайсингових варіантів CD44 в активованих лімфоцитах, а також у випадку неходжкінських лімфом (Коортман і ін., 1993).

Відомі різні підходи, що придатні для здійснення диференціальної експресії варіантного екзона гена CD44 у пухлинах і нормальних тканинах для способів діагностики і лікування (міжнародні заявки на патенти 94/02633, 94/12631, 95/00658, 95/00851, європейський патент 0531300).

Також досліджена експресія варіантних молекул CD44 при плоскоклітинному раку. Saito і ін. (1993) виявили за допомогою специфічного до v6 антитіла Var3 1 ослаблення експресії v6 у пухлинних клітинах у порівнянні з нормальними клітинами. Brooks і ін. (1995) одержали за допомогою специфічного до v6 антитіла 11 9 гетерогенне забарвлення при раку носоглотки. Тільки в 2 із 12 випадків було досягнуте сильне забарвлення, у той час, як у більшості випадків імуністологічно змогли виявити тільки слабку фокальну експресію v6.

Завдання поданого винаходу полягало в розвитку нових способів діагностики і лікування плоскоклітинного раку, а також у розробці засобів для здійснення таких способів.

Це завдання могло бути вирішене за допомогою поданого винаходу. Воно стосується способів діагностики і лікування плоскоклітинного раку, що ґрунтуються на експресії варіантного екзона v6

гена CD44 як молекулярного маркера або мішені. Зокрема, поданий винахід стосується способів, що ґрунтуються на сильній і гомогенній експресії v6 при плоскоклітинному раку, яку несподівано змогли твердо встановити, всупереч теорії, відомій при існуючому рівні техніки. Молекули антитіл із відповідною специфічністю придатні, зокрема, як лікарська основа, щоб селективно добратися *in vivo* до плоскоклітинного раку.

При цьому перевага віддається способам, які відрізняються тим, що при цьому застосовується молекула антитіла, яка впізнає амінокислотну послідовність -QWFGNRWHEGYRQT, особливо переважно амінокислотну послідовність WFGNRWHEGYR. Особливо перевага при цьому віддається моноклональному антитілу BWA-1 (клон VFF-18), що утворюється від лінії клітин пс-ридоми, депонованої 7 8 1994 під № DSM ACC2174 у Німецькій Колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSM) ГмбХ, Машеродер Бер 1b, D-38124 Брауншвейг, Німеччина (міжнародна заявка на патент 95/33771), або похідному цього антитіла.

Інші аспекти поданого винаходу стосуються застосування таких молекул антитіл, за допомогою яких здійснюються способи згідно винаходу, а також засоби для здійснення цього способу.

Відома нуклеотидна й амінокислотна послідовність варіантного екзона v6 гена CD44 (Screaton і ін., 1992, Tolg і ін., 1993). Існування дегенерованих або алельних варіантів не має значення для здійснення винаходу, тому подібні варіанти безумовно включаються.

Послідовність екзона v6 людського гена CD44 являє собою

Q A T T E S T T E E T A T Q
TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACC GAA GAA GCA GGT ACC CAG

I F C K F G K R W T T P Y R Q
AAG GAA CAG TCG CTT GGC AAC AGA TGG CAT CAG GGA TAT GGC CAA

C R E D S H E T T C T A
ACA GGC AGA GAA GAT TCC CAT TCC ACA ACC GAG GAG GGT G

Винахід може бути здійснений з поліклональними або моноклональними антитілами, специфічними до епітопу, що кодується екзоном v6, зокрема, до епітопу всередині амінокислотної послідовності QWFGNRWHEGYRQT, особливо переважно всередині амінокислотної послідовності WFGNRWHEGYR. Одержання антитіл проти відомих амінокислотних послідовностей можна здійснити відомими способами (Catty, 1989). Наприклад, пептид з такою послідовністю можна одержати синтетично і ввести як антиген до протоколу імунізації. Інший шлях включає одержання складового білка, що містить бажану амінокислотну послідовність, таким шляхом, що нуклеїнова кислота (синтетична або, наприклад, та, яка може бути отримана в результаті полімеразної ланцюгової реакції /ПЛР/ із відповідної проби), що кодує цю послідовність, інтегрується в експресуючий вектор, і складовий білок, що утворюється при злитті, експресується в організмі-господарі. При необхідності очищений складовий білок може потім бути вставлений як антиген до протоколу імунізації, і специфічні до вставки антитіла або, у випадку монокло-

нальних антитіл, гібридами, що експресують специфічні до вставки антитіла, відбираються відповідним способом. Такі способи обумовлюються рівнем техніки. Heider і ін (1993, 1996a) і Koortals і ін (1993) описують одержання антитіл проти варіантних епітопів CD44.

Для способу відповідно до винаходу можуть, однак, застосовуватись також молекули антитіл, що є похідними полі- або моноклональних антитіл, наприклад, Fab- або F(ab')₂-фрагменти імуноглобулінів, рекомбінантне отримане одноланцюгове похідне антитіла (scFv), химерне або гуманізоване антитіло, а також інші молекули, специфічно зв'язані на епітопі, які кодується екзоном v6. З повного імуноглобуліну антитіла BWA-I (VFF-18) або іншого антитіла можуть, наприклад, бути отримані Fab- або F(ab')₂-фрагменти або інші фрагменти (Kreitman і ін, 1993). Фахівець, крім того, здатний одержати рекомбінантні специфічні до v6 молекули антитіл. Зокрема, він може відповідно до аналізу амінокислотної послідовності антитіла BWA-I (VFF-18) або при застосуванні ліній клітин гібридоми, яка продукує це антитіло, особливо по генетичній інформації, що міститься в ній, одержати рекомбінантні молекули антитіл однакового ідіотипу, як, наприклад, BWA-I (VFF-18), тобто, молекули антитіл, які в області положення зв'язування антигену (ділянки, що визначають комплементарність, КВД) мають таку ж амінокислотну послідовність, що й антитіло BWA-I (VFF-18). Відповідні способи обумовлюються рівнем техніки. Такі рекомбінантні молекули антитіл можуть, наприклад, бути гуманізованими антитілами (Shin і ін, 1989, Gussow і Seemann, 1991), біспецифічними або біфункціональними антитілами (Weiner і ін, 1993, Goodwin, 1989, Featherstone, 1996), одноланцюговим похідним антитіла (scFv, Johnson і Bird, 1991), повними або фрагментарними імуноглобулінами (Coloma і ін, 1992, Nesbit і ін, 1992, Barbas і ін, 1992) або отриманими шляхом перемішування ланцюгів антитілами (Winter і ін, 1994).

Гуманізовані антитіла можуть, наприклад, бути отримані шляхом трансплантації КВД (європейський патент 0239409). Також можуть бути модифіковані каркасні ділянки (європейський патент 0519598, міжнародна заявка на патент 9007861). Для гуманізування антитіл тепер можна застосовувати такі способи, як ПЛР (див., наприклад, європейський патент 0368684, європейський патент 0438310, міжнародну заявку на патент 9207075), або комп'ютерне моделювання (див., наприклад, міжнародну заявку на патент 9222653). Можуть також бути отримані і застосовані складові білки, наприклад, складовий білок з одноланцюгового похідного антитіла і токсину (Chaudhary і ін, 1990, Friedman і ін, 1993). Під широке поняття "антитіло" або "молекули антитіл" повинні підпадати, крім поліклональних і моноклональних антитіл, всі обговорювані в цьому розділі сполуки, а також інші сполуки, що структурно походять від імуноглобулінів і одержуються відомими для цього способами.

У можливостях середнього фахівця знаходиться одержання відомостей про епітоп (див. фіг 1, фіг 4) еквівалентного BWA-I (VFF-18) антитіла з такою ж специфічністю до зв'язування. Подібні антитіла тому також включені у винахід.

Для способу діагностування молекули антитіл, переважно молекули антитіла BWA-I, їхні фрагменти або рекомбінантні молекули антитіл із подібним ідіотипом, можуть з'єднуватись, наприклад, із радіоактивними ізотопами, як, наприклад, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, або з радіоактивними сполуками (Larson і ін, 1991, Thomas і ін, 1989, Srivastava, 1989), із ферментами, наприклад, пероксидазою або лужною фосфатазою (Catty і Raykundalia, 1989), із флуоресцентними барвниками (Johnson, 1989) або з молекулами біотина (Guesdon і ін, 1979). Для терапевтичного застосування специфічні до v6 молекули антитіл, переважно молекули антитіла BWA-I (VFF-18) або молекули похідного від VFF-18 антитіла, наприклад, його фрагменти або рекомбінантні молекули антитіла з подібним ідіотипом, можуть зв'язуватись з радіоактивними ізотопами, наприклад, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ²¹²Pb, ²¹³Bi, ¹⁷⁷Lu (Quadri і ін, 1993, Lenhard і JH, 1985, Vnesendorp і ін, 1991, Wilbur і ін, 1989, Maraveyas і ін, 1995a, Juricic до Scheinberg, 1994), із токсинами (Viretta і ін, 1991, Viretta і Thorpe, 1991, Kreitman і ін, 1993, Theuer і ін, 1993), із цитостатиками (Schrapp і ін, 1992), із проліками (Wang і ін, 1992, Senter і ін, 1989), із речовинами, що фотоактивуються (Hemming і ін, 1993), із молекулою антитіла з іншою специфічністю або з радіоактивними сполуками. Молекула антитіла може далі з'єднуватись з цитокином або іншим імунomodуючим поліпептидом, наприклад, із фактором некрозу пухлини, лімфотоксином (Reisfeld і ін, 1996) або інтерлейкіном-2 (Becker і ін, 1996). Молекули антитіл для вставки в систему переднацілювання можуть бути також модифіковані, наприклад, за допомогою стрептавідину або біотину (Goodwin, 1995).

Корисно, щоб можна було у відповідності зі способом діагностики відповідно до винаходу досліджувати взяті у хворих проби, наприклад, із біопсій, по яких установлюють наявність достатніх даних для діагностування плоскоклітинного раку або вже ставиться діагноз, щоб досить докладно охарактеризувати пухлину. Виявлення варіантних молекул CD44, що містять амінокислотну послідовність, яка кодується варіабельним екзоном v6, можна здійснити на поверхні білка за допомогою антитіл або на поверхні нуклеінової кислоти за допомогою специфічних зондів нуклеінових кислот або затравок для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Винахід стосується, отже, молекул антитіл і нуклеінових кислот, придатних як, зонди або затравки для таких способів, і застосування таких антитіл і нуклеінових кислот для діагностики й аналізу плоскоклітинного раку. Наприклад, зрізи тканин можуть бути досліджувані імунгістохімічно за допомогою антитіл відомими для цього способами. Отримані з проб тканин екстракти або рідини, що містяться в організмі, можуть далі бути досліджувані іншими імунологічними способами з використанням антитіл, наприклад, Вестерн-блотингом, за допомогою ферментних імуносорбентних аналізів (ELISA-тест, Catty і Raykundalia, 1989), радіоімунних аналізів (RIA, Catty і Murphy, 1989) або застосовуваних імунних аналізів. Дослідження можуть проводитись якісно, напівкількісно або кількісно.

Поряд із діагностикою *in vitro* молекули антитіл зі специфічністю відповідно до винаходу придатні також для *in vivo* діагностики плоскоклітинного раку. Якщо молекула антитіла має детектовану мткку, можна здійснити визначення мткки для діагностичних цілей, наприклад, для візуального виявлення пухлини *in vivo* (одержання зображення) або, наприклад, для радіоспрямованої хірургії. Для застосування кон'югованих із радіоактивними ізотопами антитіл для імунної сцинтиграфії (одержання зображення) є, наприклад, ряд протоколів, на підставі яких фахівець може здійснити винахід (Sissacat і ін., 1989, Keenan і ін., 1987, Perkins і Pimm, 1992, Colcher і ін., 1987, Thompson і ін., 1984).

Дані, отримані шляхом виявлення і/або кількісної оцінки експресії варіантного епітопа v6 CD44, можуть, таким чином, використовуватися для постановки діагнозу і прогнозу. При цьому може бути корисна комбінація з іншими прогностичними параметрами, наприклад, із ступенем розвитку пухлини.

Молекули антитіл із специфічністю згідно винаходу і, при необхідності зв'язані з цитотоксичним агентом можуть із користю застосовуватися для лікування плоскоклітинного раку. При цьому застосування може бути здійснене системно або топічно, наприклад, шляхом внутрішньовенної (болюсної або тривале вливання), внутрішньоочеревинної, внутрішньом'язової, підшкірної або іншої ін'єкції/вливання. Протоколи введення кон'югованих або некон'югованих антитіл (таких, як повні імуноглобуліни, фрагменти, рекомбінантні гуманізовані молекули або інші) складають основу техніки (Mulshine і ін., 1991, Larson і ін., 1991, Vitetta і Thorpe, 1991, Vitetta і ін., 1991, Breit і ін., 1992, 1995, Press і ін., 1989, Weiner і ін., 1989, Chatal і ін., 1989, Sears і ін., 1982). Терапевтичне застосування можна, наприклад, здійснити аналогічно застосуванню антитіла 1 IASML (Seiter і ін., 1993). Немодифіковані моноклональні антитіла можуть бути встановлені безпосередньо при лікуванні, коли вони виявляють відповідну для цитотоксичної дії внутрішню ефекторну функцію, наприклад, для індукованої комплементом або індукованої антитілом клітинної цитотоксичності (Riethmuller і ін., 1994). Відповідними моноклональними антитілами для такого застосування є мишині антитіла ізо типу IgG2a або антитіла людського типу IgG1. Немодифіковані антитіла можуть далі використовуватися для індукції протипухлинної реакції, властивої хворому, по анти-ідіотипічному механізми (Baum і ін., 1993, Khazaeli і ін., 1994).

Кращий варіант здійснення винаходу з погляду використання для лікування полягає в тому, щоб гуманізований специфічний до v6 імуноглобулін або його F(ab')₂-фрагмент зв'язати з ⁹⁰Y (Quadri і ін., 1993, Vriesendorp і ін., 1995), ¹³¹I (Maraveyas і ін., 1995a, 1995b, Juweid і ін., 1995, Press і ін., 1995, Thomas і ін., у збірнику Catty 1985, crop 230-239), ¹⁸⁶Re (Breit і ін., 1992, 1995) або з іншим відповідним радіоактивним ізотопом і ввести для радіоімунотерапії плоскоклітинного раку. Наприклад, антитіло BiWA-I або гуманізована версія BiWA-I, або P(ab')-фрагмент BiWA-I або гуманізованого антитіла може зв'язуватися з ⁹⁰Y при застосуванні

хелатоутворюючого лінкера, як ізотіоціанатбензилдіетилпентриамінпентаацетат (ITCB-ДТПА), причому повинна бути досягнута питома активність у 5-20 мКі/мг, переважно 10 мКі/мг. Цей агент може потім вводитися хворому з позитивною до антигену пухлиною в дозуванні від 0,1 до 1 мКі/кг маси тіла, переважно від 0,3 до 0,5 мКі/кг маси тіла. Якщо молекула антитіла зв'язана з ¹³¹I, при питомій активності 2 мКі/мг можлива відповідна схема дозувань, наприклад, 2 x 150 мКі протягом періоду в 6 тижнів. Фахівець за допомогою відомих способів може встановити максимальну можливу дозування (Maraveyas і ін., 1995a, 1995b). При загальній кількості призначеного для введення білка від 2 до 5 мг введення може здійснюватися у вигляді швидкої внутрішньовенної болюсної ін'єкції. При великих кількостях білка вливання може здійснюватися в зручній для введення формі. У випадку моноклональних антитіл може бути необхідним, щоб агент перед введенням змішували з надлишком (наприклад, із 10-кратним молярним надлишком) нерадіоактивного антитіла, у цьому випадку краще здійснювати введення у вигляді внутрішньовенного вливання, наприклад, понад 15 хвилин. Введення може бути повторено. Лікування можна поєднати з зовнішньою променевою терапією. Далі лікування може бути підкріплено пересадкою кісткового мозку, це особливо необхідно тоді, коли при лікуванні доза більш, ніж 16 Грей, надходить в кістковий мозок.

Молекули антитіл відповідно до винаходу можуть також застосовуватися *ex vivo* для очищення від позитивних до CD34 препаратів клітинних ліній і препаратів клітин попередників (імунне очищення). Променева терапія або хімотерапія плоскоклітинного раку можуть бути підкріплені аутологічною пересадкою кісткового мозку. Використовуваний при цьому препарат кровотворних ліній клітин і клітин-попередників не повинен містити пухлинні клітини. Це може бути досягнуте шляхом інкубування з молекулами антитіл відповідно до винаходу, наприклад, кон'югатів антитіло-токсин (Myklebust і ін., 1994, патент Німеччини 196 48 209 7).

Молекули антитіл відповідно до винаходу можуть далі вводитися у вигляді рекомбінантної конструкції в Т-клітинний рецептор Т-лімфоцитів. Такі репрограмовані Т-лімфоцити зв'язуються селективно на пухлинних клітинах, що експресують антиген, і виявляють цитотоксичну дію, таким чином, вони можуть застосовуватися для лікування плоскоклітинного раку (PCT/EP9604631, Altenschmidt і ін., 1996).

Фіг 1. Визначення специфічності до епітопу антитіла BiWA-I шляхом зв'язування на синтетичних пептидах, що походять від послідовності людського CD44v6.

Відповідний пептид CD44v6 щурів випробували з антитілом 1 IASML. Зв'язування визначали за допомогою ELISA-тесту, причому пептиди були іммобілізовані на планшетах для титрування (для порівняння, Heider і ін., 1996b, фіг 2) - немає зв'язування, +/- слабе зв'язування, + сильне зв'язування.

Фіг 2. Імуногістохімічні аналізи плоскоклітинного раку гортані (a) і метастазу в печінку раку стра-

воходу (б) за допомогою специфічного до CD44v6 моноклонального антитіла BWA-I

В обох випадках можна спостерігати реактивність антитіла по відношенню до мембрани пухлинних клітин. Початкове збільшення 40х, додаткове забарвлення гематоксиліном

Фіг 3 Порівняння зв'язування антигену різних специфічних до CD44v6 моноклональних антитіл

Зв'язування чотирьох різних специфічних до CD44v6 моноклональних антитіл на людських клітинах A-431 плоскоклтинного раку вимірювали за допомогою ELISA-тесту. Моноклональне антитіло BWA-I, демонструє більш високу спорідненість до пухлинних клітин, ніж інші моноклональні антитіла

Фіг 4 Рафіноване картування епітопа моноклонального антитіла BWA-I

Зв'язування BWA-I на різних синтетичних пептидах, що перекриваються, які охоплюють амінокислоти 18-32 кодованою CD44v6 ділянкою, вимірювали в конкурентному ELISA-ТЕСТІ. Підкреслена мінімальна послідовність зв'язування (пептид v6(19-29))

Фіг 5 Біорозподіл міченого ¹²⁵I BWA-I у безволосих мишей, підданих ксенотрансплантації A-431. Акумуляція антитіла встановлюється як % ін'єксованої дози ІД/г (середнє значення ± стандартна помилка вимірювання) через 4, 24, 48, 120 і 168 годин після ін'єкції

Приклад 1. Експресія CD44v6 при плоскоклтинному раку

Тканина

Загалом в 126 випадках аналізували імуногістохімічно запарафіновані пухлинні проби за допомогою моноклонального антитіла BWA-I (клон VFF-18) на експресію CD44v6. У 31 випадку проби включали первинний плоскоклтинний рак (у 15 випадках гортані, у 16 випадках шкіри), у 91 випадку включали метастази в лімфатичні вузли (гортань, n=38, легень, n=27, стравохід, n=11, порожнина рота, n=11, мигдалики, n=4) і в 4 випадках включали метастази в печінку (стравохід)

Антитіло

Загальна варіантна ділянка НРКІІ-типа CD44v(Hofmann і ін., 1991) була ампліфікована шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із кДНК людських кератиноцитів. Обидві затратки ПЛР 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3', положення 25-52, і 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', положення 1013-984 варіантної ділянки LCLC97, як описано Hofmann і ін., містили сайт впізнавання рестриктазою EcoRI, який використовувався, щоб безпосередньо клонувати продукт ПЛР у вектор pGEX-2T (Smith і ін., 1988). Конструкція, що утворюється в результаті, (pGEX CD44v НРКІІ, v3-v10) кодує складовий білок із молекулярною масою біля 70кДа, що складається з глутатіон-8-трансферази *Schistosoma japonicum* і екзонів v5-v10 людського CD44 (фіг 1, Heider і ін., 1993). Складовий білок експресували в E coli і потім надавали очищенню за допомогою афінної хроматографії на глутатіон-агарозі (Smith і ін., 1988)

Самок мишей Balb/c імунізували внутрішньочеревинно очищеним афінною хроматографією складовим білком за такою схемою

1 імунізація 90мкг складового білка в повному

ад'юванті Фрейнда

2 і 3 імунізації 50мкг складового білка в повному ад'юванті Фрейнда. Імунізації здійснювали з інтервалом у 4 тижні. Через 14 днів після останньої імунізації тварин ще раз імунізували протягом трьох наступних днів щораз 10мкг складового білка в забуференому фосфатом фізіологічному розчині (ЗФР). На наступний після цього день клітини селезінки однієї тварини з високим титром антитіл піддавали злиттю з мишиними мієломними клітинами P3 X63-Ag8 653 за допомогою поліетиленгліколя 4000. Клітини гібридомі потім піддавали селекції на планшетах для титрування в середовищі, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище ГАТ) (Kohler і Milstein, 1975; Kearney і ін., 1979)

Визначення титру антитіл у сироватці або скринінг гібридом проводили за допомогою ELISA-тесту. У такому тесті планшети для титрування спочатку покривали складовим білком (глутатіон-5-трансфераза-CD44v3-10) або тільки глутатіон-5-трансферазою. Потім інкубували із серійними розведеннями сироваткових проб або гібридом і визначали специфічні антитіла за допомогою кон'югованих із пероксидазою антитіл проти мишиного імуноглобуліну. Гібридами, що реагували тільки з глутатіон-5-трансферазою, відкидалися. Антитіла, що залишилися, спочатку характеризували в ELISA-тесті за допомогою специфічних до домену складових білків (екзон v3, екзон v5 + v6, екзон v6+v7, екзон v8-v10) (Koorman і ін., 1993) їхню імуногістохімічну реактивність випробовували на зрізах шкіри людини

BWA-I (VFF-18, про одержання і властивості див. також у міжнародній заявці на патент 95/33771) зв'язувалося тільки на складових білках, що містили домен, який кодувався екзоном v6. Щоб далі встановити межу епітопа антитіла, у ELISA-тесті були використані різні синтетичні пептиди, що являють собою частини домена v6 (фіг 1). Пептид із 14 амінокислот, v6D, продемонстрував найсильніше зв'язування. Отже, епітоп BWA-I лежить цілком або частково усередині послідовності QWFGNRWHEGYRQT домена, що кодується екзоном v6. Ця послідовність гомологічна епітопу зв'язування антитіла 11ASML, що було застосовано, в терапевтичній щурячій моделі і котре специфічне до щурячого CD44v6 (фіг 1)

Імуногістохімія

Перед інкубуванням із первинним антитілом парафінові зрізи (4мкм) депарафінували в обертовому пристосуванні для гістологічних досліджень (фірма Рот, Німеччина) три рази, кожного разу по 10 хвилин, і потім регідрували у вищих спиртах. Зрізи швидко промивали дистильованою водою і потім кип'ятили в мікрохвильовій печі (модель Шарп R-6270) тричі по 10 хвилин при 600Вт у 0.01M буфері, що містить лимонну кислоту - цитрат натрію. Після кожного інкубування в мікрохвильовій печі зрізи охолоджували 20 хвилин. Після останнього охолодження носії промивали в ЗФР і передінкубували з нормальною козячою сироваткою (10% у ЗФР). Після трьох промивань у ЗФР зрізи інкубували протягом години з первинним антитілом (BWА-I 5мкг/мл, мишачий IgG (відповідний ізотипу негативний контроль) 5мкг/мл в

ЗФР/1%, бичому сироватковому альбуміні (БСА)) Як позитивний контроль для кольорової реакції використовували нормальні людські зрізи шкіри, оскільки кератиноцити експресують ізоформу CD44, що містить v3-v10 Ендогенні пероксидази, блокувані 0,3% перекисом водню в ЗФР, і зрізи інкубували протягом 30 хвилин із біотинільованим вторинним антитілом (протимишиний IgG-F(ab')₂, корпорація ДАКО) Для розвитку забарвлення зрізи інкубували 30 хвилин із пероксидазою хрому, що зв'язувалася на біотині в комплекс стрептавідин-біотин-пероксидаза (корпорація ДАКО) Потім зрізи інкубували 5-10 хвилин у 3,3-діаміно-9-етилкарбазольному субстраті (фірма Сигма Іммунокемікалс), реакцію зупиняли додаванням води і зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Оцінку забарвлення проводили за допомогою аксіоскопічного світлового мікроскопа Цейсса, інтенсивність забарвлення кількісно оцінювали в такий спосіб +++ , сильна експресія, ++, помірна експресія, +, слабка експресія, -, не детектована одно-значно експресія або відсутність детектованої експресії Тільки пухлинні клітки з чітким забарвленням мембрани оцінювалися як позитивні Відсоток позитивних пухлинних клітин приблизно оцінювали в кожному зрізі і були сформовані дві групи фокально позитивні пухлини (менше 10% пухлинних клітин реагували з антитілом) і позитивні пухлини (10 або більш % пухлинних клітин позитивні) Коли менше 80% пухлинних клітин у позитивних клітинах реагували з антитілом, одержували відповідне значення у відсотках

За допомогою специфічного до CD44v6 моно-

клонального антитіла BWA-I аналізували 126 випадків плоскоклітинного раку різного походження Експресія CD44v6-вмісних ізоформ спостерігалася в усіх, крім однієї, пухлинних пробах Більша частина проб показала експресію антигену на 80-100% пухлинних клітин, забарвлення обмежувалося мембраною пухлинних клітин Ніякої реакції не спостерігали у випадку стромальної тканини, лімфоцитів, м'язових клітин або ендотелію

Для кількісної оцінки експресії молекул CD44v6 на цих пухлинних клітинах забарвлювали зрізи нормальної шкіри людини паралельно зі зрізами пухлин Нормальні кератиноцити шкіри експресують високий рівень ізоформ CD44 і вважаються такими, що найсильніше експресують CD44v6 серед нормальних клітин, описаних на сьогоднішній день Тому забарвлення кератиноцитів було прийнято за еталон і класифіковане як "сильне" (+++) у застосованій системі оцінки У більшості досліджуваних пухлинних проб забарвлення пухлинних клітин було таким же, або навіть сильнішим, ніж забарвлення кератиноцитів шкіри, тільки в деяких випадках спостерігалася слабка забарвлення пухлини (3 випадки метастазів у лімфатичні вузли) або помірне (2 первинних раки, 10 метастазів) Реакція забарвлення була абсолютно гомогенною усередині певного пухлинного зрізу, причому більшість пухлинних клітин зрізу мали однакову інтенсивність забарвлення У експресійному зразку CD44v6 не спостерігали ніяких істотних відмінностей між первинними пухлинами і метастазами Докладні підсумовані результати наведені в таблиці 1, приклади подані на фіг 2

Таблиця 1

Експресія CD44v6 при плоскоклітинному раку

Проба			Тип пухлини		Реактивність BWA-I
1			2		3
46937	86		первинна	гортані	+++*
4687	90		первинна	гортані	+++
8372	90		первинна	гортані	+++
17427	90		первинна	гортані	+++
27298	90		первинна	гортані	+++
46908	90		первинна	гортані	+++
51334	90		первинна	гортані	+++
51402	91		первинна	гортані	+++
60414	91		первинна	гортані	+++
61733	91		первинна	гортані	+++
12280	92		первинна	гортані	+++
23140	92		первинна	гортані	+++
31792	92		первинна	гортані	+++
32214	92		первинна	гортані	+++
10209	95		первинна	гортані	+++
2366	88		первинна	шкіри	+++
2574	86		первинна	шкіри	+++
9916	86		первинна	шкіри	++/+++

Продовження таблиці 1

1			2		3
2696	87		первинна	шкіри	+++
8908	87		первинна	шкіри	+++
8191	88		первинна	шкіри	+++
8354	88		первинна	шкіри	++50%
11963	88		первинна	шкіри	++
5590	90		первинна	шкіри	++/+++
530	92		первинна	шкіри	+++
2583	94		первинна	шкіри	+++
11337	94		первинна	шкіри	+++
10901	95		первинна	шкіри	+++
11557	95		первинна	шкіри	+++
11744	95		первинна	шкіри	+++
11917	95		первинна	шкіри	+++
4688	90	I	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	++/+++
4688	90	II	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	-
8374	90		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
17428	90		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
27300	90		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
36942	90		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
46909	90		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	++
51336	90		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
41108	91		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
51398	91		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
60416	91		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
61734	91		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
1318	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
1318	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
1318	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
1318	92	IV	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
2863	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
2863	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
5745	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
5745	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
8969	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
8969	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
8969	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	++
8969	92	IV	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
8969	92	2/I	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
8969	92	2/II	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
8969	92	2/III	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	++
8969	92	2/IV	Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+/+++
9366	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
9509	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
9566	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
12283	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
14046	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
31787	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
49228	92		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++50%
29228	93		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	+++
29829	93		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	++
29804	95		Метастаз у лімфатичний вузол	гортані	++/+++
15293	91		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+25%
1667	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+20%
2757	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
2757	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
2757	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
2757	92	IV	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
4790	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++

Продовження таблиці 1

1			2		3
6168	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	++50%
6168	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
6168	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
6168	92	IV	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
7206	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
7531	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
7531	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
7531	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	++/+++
7531	92	IV	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
10324	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
10519	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
10519	92	RMSII	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
10958	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
11425	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
11425	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
13055	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	++/+++
13055	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	Фокальна+++
13055	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
15663	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
16713	92		Метастаз у лімфатичний вузол	легені	+++
14980	91	I	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
14980	91	II	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
16841	91	I	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
16841	91	II	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
16841	91	III	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
1059	92		Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+
1710	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
1710	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
1710	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
11502	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	+++
11502	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	стравоходу	++
202	92		Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	++60%
6030	92		Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	++/++/+++25%
7335	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++
7335	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++
15324	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++70%
16164	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++
16164	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++50%
16412	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	++/+++
16836	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++
16836	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++
16836	92	III	Метастаз у лімфатичний вузол	порожнини роту	+++
6228	92	I	Метастаз у лімфатичний вузол	мигдалика	+++
6228	92	II	Метастаз у лімфатичний вузол	мигдалика	+++
6618	92		Метастаз у лімфатичний вузол	мигдалика	+++
11840	92		Метастаз у лімфатичний вузол	мигдалика	++
14172	91	4	Метастаз у печінку	стравоходу	+++
14172	91	5	Метастаз у печінку	стравоходу	+++
4131	94	I	Метастаз у печінку	стравоходу	++/++
8438	94		Метастаз у печінку	стравоходу	фокальна++/+++

Позитивно реагували з BIWA-I 80-100% пухлинних клітин. У випадках, коли менша кількість пухлинних клітин реагувала з антитілом, зазначене відповідне число відсотків.

Приклад 2. Експресія CD44v6 при раку нирки, раку простати і метастазах у печінку при раку товстого кишечника/

Тканина

Аналізували 19 випадків раку нирки (12 випадків світлоклітинного раку, 5 випадків хромофільного, 1 випадок хромофобного, 1 онкоцитому), 16 випадків первинної аденокарциноми простати і 19 випадків метастазів у лімфатичні вузли при раку товстого кишечника.

Антитіло

BIWA-I (див. приклад 1)

Імунохімія

Для проведення дослідження див. приклад 1

На відміну від плоскоклітинного раку в більшості вивчених випадків раку нирки і простати не могла бути виявлена яка-небудь експресія або виявляли тільки фокальну експресію ізоформ CD44v6. У випадку експресії, більшої, ніж фокальна, при раку простати забарвлення було переважно дифу-

зним цитоплазматичним і слабким або гетерогенним у порівнянні з забарвленням нормального епітелію простати. У 50% досліджених метастазів у печінку при раку товстого кишечника виявлялася більша, ніж фокальна, експресія ізоформ CD44v6. Забарвлення в більшості випадків було від слабого до середнього, причому в більшості випадків менше 100% пухлинних клітин проби продемонстрували забарвлення з BIWA-I. Результати підсумовані в таблиці 2.

Таблиця 2

Експресія CD44v6 при аденокарциномі простати, раку нирки і метастазах у печінку при раку товстої і прямої кишки

Тип пухлини		n	Реактивність BIWA-I		
			негативна	фокально-позитивна	позитивна
Аденокарцинома простати	первинна	16	8	3	5
Аденокарцинома простати	метастази в лімфатичні вузли	19	15	2	2
Рак нирки	первинна	19	17	0	2
Рак товстої і прямої кишки	метастази в печінку	30	7	8	15

Приклад 3. Характеристика специфічних до CD44v6 антитіл

Лінія клітин

Лінія клітин A-431 плоскоклітинного раку людини (спонтанний епідермоїдний рак вульви) була отримана в Американській Колекції типових культур (Rockwell MD) і культивувалася відповідно до вказівок виготовлювача. Поверхневу експресію ізоформ, що містять CD44v6, визначали при аналізі за допомогою установки для сортування клітин зі збудженням флуоресценції (FACS-аналіз), причому використовували моноклональне антитіло BIWA-I, з'єднане з флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC).

Аналіз кінетичних констант

Визначення спорідненості і кінетики взаємодії моноклонального антитіла і CD44v6 було проведено за допомогою поверхневого плазменного резонансу (ППР), причому була використана система BIACore 2000 (фірма Фармація Байєсенсор). Складовий блок, що включає глутатіон-S-трансферазу і CD44, який містив ділянку, кодовану екзонами v3-v10 (глутатіон-3-трансфераза/CD44 v3-v10), був іммобілізований на сенсорному чіпі CM5, причому був використаний спосіб поєднання з аміном відповідно до вказівок виробника.

Антитіло в різних концентраціях (8-132 нм) в буфері HBS (10 мМ 'N-(2-гідрокси)етилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота рН 7.4, 150 мМ хлорид натрію, 3.4 мМ етилендіамінтетраоцтова кис-

лота /ЕДТК/, 0.05% поверхнево-активна речовина P20 BIAcore) ін'єктували через специфічну до антигену поверхню при швидкості потоку 5 мкл/хв. Взаємодію розраховували по зміні сигналу ППР. Дисоціацію антитіла спостерігали протягом 5 хвилин у потоці буфера (HBS). Поверхню чіпа регенерували за допомогою окремого імпульсу в 15 мкл 30 мМ соляної кислоти. Аналіз даних і розрахунок кінетичних констант проводили за допомогою програмного забезпечення для оцінки BIA (фірма Фармація Байєсенсор), версія 2.1.

Таким способом порівнювали спорідненість до антигену моноклонального антитіла BIWA-I і інших специфічних до CD44v6 моноклональних антитіл (VFF4, VFF7, BBA-13 (IgG1, системи R&D, Абіндон, Англія)). Кінетичні константи і константи спорідненості різних антитіл визначали в кожному випадку в двох незалежних експериментах. У таблиці 3 наведені значення швидкостей асоціації (k_a), швидкостей дисоціації (k_d) і констант дисоціації (K_d) для чотирьох моноклональних антитіл. Всі моноклональні антитіла мали подібні k_a і k_d , за винятком BBA-13, яке мало в 3 рази меншу k_a і VFF7, що показало значно вищу швидкість дисоціації (фактор 5) у порівнянні з іншими моноклональними антитілами. Це приводить у результаті до зниженої спорідненості до зв'язування для VFF7 і BBA-13 у порівнянні з VFF4 і BIWA-I. Антитіло BIWA-I має найнижчу K_d із усіх досліджуваних антитіл.

Таблиця 3

Кінетичні константи і константи спорідненості різних специфічних до CD44v6 моноклональних антитіл

Антитіло	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_d(M)$
VFF4	1.1×10^5	2.6×10^{-5}	2.4×10^{-10}
VFF7	1.1×10^5	1.2×10^{-4}	1.1×10^{-9}
BiWA-I	1.3×10^5	2.2×10^{-5}	1.7×10^{-10}
BBA-13	3.7×10^4	2.3×10^{-5}	6.2×10^{-10}

Аналіз взаємодії антитіло-білок за допомогою ELISA-тесту

Клітини A-431, що експресують CD44v6, культивували в 96-лункових планшетах (фірма Фалкон Мікротест III, Бектон Дікінсон, Лінкольн Парк, Нью-Джерсі) по 5×10^4 клітин в лунці в середовищі RPMI 1640 із 10% навколоплідною сироваткою теляти (НСТ) протягом ночі при 37°C. Після промивання 3ФР/0,05% твіном 20 клітини фіксували охолодженим до 0°C етиловим спиртом протягом 1 хвилини, після чого промивали. Інкубування з первинними антитілами (VFF4, VFF7, BiWA-I, BBA-13, 1нг/мл-600нг/мл, у кожному випадку в буфері для випробування 3ФР/ 0,5% БСА/ 0,05% твін 20) проводили протягом 1 години при кімнатній температурі і потім тричі промивали. Як вторинне антитіло використовували кроляче кон'юговане з пероксидазою хрому антитіло проти мишиного Ig (корпорація ДА-КО, Копенгаген, Данія, розведення 1:6000 у буфері для випробування) (1 година/ при кімнатній температурі). Після трьох промивань забарвлювали за допомогою розчину тимолового синього (фірма Кіркегаард + Перрі, Гайтсбург, США). Екстинкцію вимірювали за допомогою зчитувального пристрою фірми Хьюлет-Паккард, використовуюваного в ELISA-тесті.

На фіг 3 показано, що відносна спорідненість антитіла, як це було визначено шляхом ВІАсоге-аналізу, відображається в їхній взаємодії з пухлинними клітинами, причому BiWA-I чітко демонструє найвищу спорідненість до зв'язування.

Домен білка, що кодується екзоном v6 гена CD44, складається з 45 амінокислот (фіг 4). Щоб точно визначити епітоп, що впізнається BiWA-I, у ELISA-випробуваннях використовували серію синтетичних пептидів. Попередні експерименти свідчать про зв'язування на розташованому в центрі 14-мері (амінокислотні залишки 18-31, фіг 4, порівн. також фіг 1), а не на пептиді поза цією ділянкою. Тому була синтезована друга серія пептидів і досліджена в конкурентних ELISA-тестах (фіг 4). Результати показують, що пептид 19-29 (WFGRNWHEGYR) являє собою мінімальну структуру, що вимагається для високоафінного зв'язування. Елімінування С-кінцевого аргінінового залишку приводить до ослабленого більш, ніж у 100 разів, зв'язування.

Приклад 4 Біорозподіл міченого радіоактивним йодом антитіла до CD44v6 у безволосих мишей із ксенотрансплантатом

Модель ксенотрансплантата A-431

Восьмитижневим самкам безволосих мишей BALB/c nu/nu (фірма B & K Юніверсал, Рентой, Західна Африка) ін'єктували підшкірне в лівосторонню середню лінію 5×10^6 культивованих клітин

A-431 (людський епідермоїдний рак вульви). Тварин після ксенотрансплантації, які мали пухлини A-431, використовували протягом двох тижнів в експериментах з біорозподілу (маса пухлини 40-50мг).

Введення радіоактивного йоду в BiWA-I

Блок G - очищене моноклональне тіло BiWA-I (мишачий IgG1) зв'язували на стрептавідині, причому використовували гетеробіфункціональний поперечний зшивач, сукцинімідильний ефір 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбонової кислоти. Лізильні залишки стрептавідину зв'язували на відновлених цистеїнільних залишках антитіла, що утворювалися при попередній обробці антитіла дитіотреїтом. Отримані кон'югати (1:1) (>90%) дали очищали за допомогою іонообмінної хроматографії. Для експериментів з біорозподілу BiWA-I стрептавідин митили ^{125}I по первинній аміногрупі лізину, причому для введення мткі використовували п-йодфенільний реагент (ПЙФ, фірма НЕН Дюпон, Вільмінгтон, Німеччина), згідно способу Willbur і ін (1989). Марнування BiWA-I стрептавідином або ^{125}I не змінювало імунореактивності або фармакокінетики антитіла в мишей.

Експерименти з біорозподілу

Безволосих мишей, що піддалися ксенотрансплантації людськими пухлинами A-431, ін'єктували внутрішньовенне через латеральну хвостову вену 5-7мкCi ^{125}I на 50мкг моноклонального антитіла BiWA-I (питома активність 0.1-0.14мкCi/мг). Вивчення біорозподілу в залежності від часу проводили в групах із 3 тварин (n=3) через 4, 24, 48, 120 і 168 годин після ін'єкції. В обрані часові моменти мишей присипляли, знекровлювали через ретроорбітальне сплетення й умертвляли шляхом декапітації. Збирали дев'ять органів і тканин і подрібнювали, до них відносяться кров, хвіст, легеня, печінка, селезінка, шлунок, нирки, кишечник і пухлина. Радіоактивність у тканинах розраховували в порівнянні зі стандартом ін'єктованого препарату антитіла в гаммасцинтиляційному лічильнику (фірма Паккард Інструмент Компані, Мерден, Коннектикут), причому енергетичне вікно лічильника встановлювалося на 25-80кеВ для ^{125}I . Розраховували відсоток ін'єктованої дози/г тканини (% ID/g).

Попередні експерименти показали, що BiWA-I не реагує перехресне з мишиним антигеном CD44v6. У таблиці 4 і на фіг 5 показане поглинання радіоактивності в пухлинах і нормальній тканині. У випадку йодованого BiWA-I спостерігалось швидке поглинання пухлиною (7.6% ID/g на 4 години після ін'єкції), що збільшувалося до більш ніж 18% ID/g на 48 годину і потім залишалося постійним до 120 годин. Через 7 днів після ін'єкції (168 годин) пухлина містила ще 15.3% ID/g тканини.

Пропорції пухлина тканина були обчислені на окремі моменти часу і наведені в таблиці 4. Через 24 години після ін'єкції пропорція пухлинажров складала 0,48 і піднялася до 3,16 на сьомий день. Поглинання в нормальній тканині було низьким і швидше за все викликалося фоновим значенням кров'яного пулу в біопсійній тканині. При селектив-

ному націлюванні in vivo ксенотрансплантатів плоскоклітинного раку людини безволосим мишам показано за допомогою міченого ^{125}I BIWA-I, що моноклональне антитіло має високий потенціал як націлюючий носій для діагностичного і терапевтичного застосування у хворих плоскоклітинним раком.

Таблиця 4

Пропорції ^{125}I -BIWA-I пухлинатканина у безволосих мишей із пухлиною A-431 до різних моментів часу після ін'єкції

Відношення пухлини до	4 години	24 години	48 годин	120 годин	168 годин
крові	0,22 ^a	0,48	1,31	2,60	3,16
хвоста	1,18	2,62	7,70	12,28	13,06
легені	0,40	1,03	2,65	7,04	4,82
печінки	0,94	1,18	2,28	3,57	3,24
селезінки	1,40	1,84	4,00	4,86	4,42
шлунку	3,89	7,37	19,40	25,56	33,96
нирки	0,82	1,31	2,72	2,79	2,53
кишечника	3,54	6,24	11,94	19,24	27,78

^a Середні значення (n=3), стандартні відхилення < 7%

Приклад 5. Різна експресія CD44v6 для великої кількості пухлин людини. В іншому дослідженні вивчали імуногістохімічно в цілому 544 пухлинні проби за допомогою моноклонального антитіла BIWA-I (клон VFF-18) на експресію CD44v6. Проби або парафінували, або зразу після хірургічного взяття заморожували в рідкому азоті і берегли до використання при -70°C. Аналізували наступні пухлини: базаліоми (n=16), аденокарциноми (АК) молочної залози (n=55), АК товстої кишки (n=83), плоскоклітинний рак (ПКР) голови і шиї (n=125),

рак легені (n=120), АК простати (n=34), рак нирик (n=27), ПКР шкіри (n=15) і АК шлунка (n=69). Тканини одержували шляхом звичайного хірургічного втручання або шляхом взяття біопсії, одержання нормальної тканини супроводжувало одержання пухлинних проб. Імуногістохімічне дослідження проводили, як у прикладі 1.

У таблиці 5 поданий огляд, що стосується імуногістохімічного аналізу 397 різних пухлинних проб за допомогою моноклонального антитіла BIWA-I.

Таблиця 5

Експресія CD44v6 у людських пухлинах

Тип		Усього n	Позитивні випадки	
			n	%
Базаліома	первинна пухлина	16	10	62
АК молочної залози	первинна пухлина	17	15	88
	метастази в лімфатичні вузли	34	31	91
	метастази в печінку	4	4	100
АК товстої кишки	метастази в лімфатичні вузли	51	21	41
	метастази в печінку	26	13	50
	метастази в головний мозок	6	6	100
ПКР гортані	метастази в лімфатичні вузли	18	18	100
АК легені	первинна пухлина	35	15	43
ПКР легені	первинна пухлина	9	9	100
ПКР стравоходу	первинна пухлина	20	20	100
АК простати	первинна пухлина	16	5	31
	метастази в лімфатичні вузли	18	0	0
Рак нирки	первинна пухлина	27	5	18
ДКРЛ	первинна пухлина	31	7	23
АК шлунка	первинна пухлина	22	15	68
	метастази в лімфатичні вузли	43	16	37
	метастази в печінку	4	4	100
Усього n		397		

* > 10% пухлинних клітин позитивні
ДКРЛ - дрібноклітинний рак легені

При дрібноклтинному раку легені, раку нирки й АК простати не спостерігали або спостерігали тільки незначну реактивність. Всі інші досліджувані, типи пухлин експресували CD44v6-вмісні ізоформи в різних кількостях. Більшість досліджуваних АК молочної залози показало реактивність із BVWA-1, а досліджувані типи ПКР (гортані, легені і стравоходу) експресували CD44v6 у 100% випадків.

Усього було досліджено 185 випадків ПКР різ-

них типів і різної класифікації на реактивність із BVWA-1. Це були 67 випадків первинного ПКР (гортані, n=15, порожнини рота, n=16, ротоглотки, n=3, шкіри, n=15), 77 проб метастазів у лімфатичні вузли (гортані, n=12, легеня, n=27, стравохід, n=11, порожнина рота, n=6, ротоглотка, n=7, гортаноглотка, n=10, мигдалик, n=4) і 3 проби з метастазів у печінку (стравохід). У таблиці 6 наводяться результати імуногістохімічного аналізу всіх досліджуваних проб ПКР.

Таблиця 6

Експресія CD44v6 при плоскоклтинному раку

Тип		Усього n	Негативна		Фокальна поз		Позитивна	
			n	%	n	%	n	%
Гортаноглотка	МЛВ	10	0	0	0	0	10	100
Ротоглотка	ПП	3	0	0	0	0	3	100
	МЛВ	7	0	0	0	0	7	100
Гортань	ПП	15	0	0	0	0	15	100
	МЛВ	30	1	3	0	0	29	97
Легеня	ПП	18	2	11	0	0	16	89
	МЛВ	27	0	0	1	4	26	96
Стравохід	ПП	20	0	0	1	5	19	95
	МЛВ	11	0	0	0	0	11	100
	МП	3	0	0	0	0	3	100
Порожнина рота	ПП	16	0	0	0	0	16	100
	МП	8	0	0	0	0	6	100
Шкіра	ПП	15	0	0	0	0	15	100
Мигдалик	МЛВ	4	0	0	0	0	4	100
Усього n		185						

Фокальна поз < 10% пухлинних клітин позитивні, МЛВ метастази в лімфатичні вузли, ПО первинна пухлина, МП метастази в печінку.

Експресія, що містять CD44v6-вмісних ізоформ, була виявлена в усіх, крім трьох, пухлинних пробах (один випадок гортані, 2 випадки легеня). Більшість проб показало експресію антигену на 80-100% пухлинних клітин усередині одного окремого зрізу, причому забарвлення переважно концентрувалося на мембрані пухлинних клітин. Найсильніше забарвлений однорідний зразок спостерігали у випадку раку гортані, стравоходу і гортаноглотки, причому більшість пухлинних клітин зрізу мали однакову інтенсивність забарвлення.

Література

Altenschnmidt U, Kahl R, Moritz D, Schnierle BS, Gerstmayer B, Wels W, Groner B. Cytophysis of tumor cells expressing the neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by gene-j ctically targeted naive T lymphocytes. *Clinical Cancer Res* 2: 1001-1008 (1996).

Barbas C F, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones T M, Zebbede S L, Persson M A A, Kara P L, Norrby E, Burton D R. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9339-9343 (1992).

Baum RP, Noujaim AA, Nanci A, Moebus V, Hertel A, Niesen A, Donnerstag B, Sykes T, Boniface G, Hor G. Clinical course of ovarian cancer patients under repeated stimulation of HAMA using MAbs OC125 and B43.13. *Hybridoma* 12(5): 583-589

(1993).

Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proc natl Acad Sci USA* 93: 7826-7831 (1996).

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. Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials. *J Nucl Med* 33: 1099-1112 (1992).

Breitz H B, Durham J S, Fisher D R, Weiden P L, DeNardo G L, Goodgold H M, Nelp W B. Pharmacokinetics and normal organ dosimetry following intraperitoneal rhenium-186-labeled monoclonal antibody. *J Nucl Med* 36: 754 (1995).

Brooks L, Niedobitek G, Agathangelou A, Farrell PJ. The expression of variant 30 CD44 in nasopharyngeal carcinoma is unrelated to expression of LMP-1. *Am J Pathol* 146(5): 1102-12 (1995).

Catty D (Hrsg). *Antibodies Vols I and II*. IRL Press Oxford (1989).

Catty D, Raykundalia C. ELISA and related immunoassays. In: Catty D (Hrsg). *Antibodies Vol II*. IRL Press Oxford (1989), 97-152, s. S. 105-109.

Catty D, Murphy G. Immunoassays using radiolabels. In: Catty D (Hrsg). *Antibodies Vol II*. IRL Press Oxford (1989), 77-96.

Chatal J-F, Saccavini J-C, Geste J-F, Thedrez P,

Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibe D, Fumoleau P, Guillard Y. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas. *Cancer Res* 49: 3087-3094 (1989)

Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins. *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, Schiom J. Complementation of intracavitary and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with carcinoma. *Cancer Res* 47: 4218-4224 (1987)

Coloma M J, Hastings A, Wims L A, Morrison S L. Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *Immunol Methods* 152: 89-104 (1992)

Featherstone C. Bispecific antibodies: the new magic bullets. *Lancet* 348: 536 (1996)

Friedmann P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chace D, Trail P A, Brown J P, Siegal C B. BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res* 53: 334-339 (1993)

Gerretsen M, Visser GWM, Brakenhoff RH, van Walsum M, Snow GB, van Dongen GAMS. Complete ablation of small squamous cell carcinoma xenografts with ¹⁸⁸Re-labeled monoclonal antibody E48. *Cell Biophysics* 24/25: 135-141 (1994)

Goodwin D A. A new approach to the problem of targeting specific monoclonal antibodies to human tumors using anti-hapten chimeric antibodies. *J Mol Med Biol* 16: 645 (1989)

Goodwin D A. Tumor pretargeting: almost the bottom line. *J Nucl Med* 36(5): 876-879 (1995)

Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haufmann L, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, and Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24 (1991)

Guesdon J I, Ternynck T, Avrameas S. *J Histochem Cytochem* 27: 1131 (1979)

Gussow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 203: 99-121 (1991)

Heider K-H, Hofmann M, Horst E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, and Pals S T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 120: 227-233 (1993)

Heider K-H, Mulder J-W R, Ostermann E, Susani S, Patzelt E, Pals S T, Adolf G R. Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumor cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys. *Eur J Cancer* 31A: 2385-2391 (1995)

Heider K H, Ratschek M, Zatloukal K, Adolf G R. Expression of CD44 isoforms in human renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 428: 267-273 (1996a)

Heider W, Sproll M, Susani S, Patzelt E,

Beaumier P, Ostermann E, Ahorn H, Adolf G R. Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* in press 1996

Hemming AW, Davis NL, Finley RJ. Photodynamic therapy of squamous cell carcinoma: an evaluation of an anti-EGFR monoclonal antibody-protoporphyrin conjugate. *Society of Surgical Oncology, 46th Annual Cancer Symposium* March 18-21, 1993, Los Angeles, CA, p 67

Hofmann M, Rudy W, Zoller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P, and Gunthert U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51: 5292-5297 (1991)

Johnson G D. Immunofluorescence. In: Catty D (Hrsg.) *Antibodies Vol II*. ERL Press Oxford (1989), 179-200, s S 180-189

Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 203: 88-98 (1991)

Jurcic JG, Scheinberg DA. Recent Developments in the radioimmunotherapy of cancer. *Current Opinion in Immunology* 6: 715-721 (1994)

Juwied M, Sharkey R M, Markowitz A, Behr T, Swayne L C, Dunn R, Hansen H J, Shevitz J, Leung S-O, Rubin A D, Herskovic T, Hanley D, Goldenberg D M. Treatment of Non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled murine, chimeric, or humanized LL2, an anti-CD22 monoclonal antibody. *Cancer Res (Suppl)* 55: 5899s-5907s (1995)

Keamey J F, Radbmch A, Liesegang B, Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* 123: 1548 (1979)

Keenan A M, Weinstein J N, Carrasquillo J A, Bunn P A, Reynolds J C, Foon K A, et al. Immunopharmacology and the dose dependence of ¹¹¹In-labeled T101 monoclonal antibody in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* 47: 6093-6099 (1987)

Khazaeli MB, Cory RM, LoBuglio AF. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother* 15: 42-52 (1994)

Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495 (1975)

Koopman G, Heider K-H, Horts E, Adolf G R, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals S T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of 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 I. Pseudo-monoclonal exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res* 53: 819-825 (1993)

Larson S M, Cheung N-K V, Leibel S A. Radioisotope Conjugates. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.) *Biologic therapy of cancer*. J B Lippincott Corp, Philadelphia, 496-511 (1991)

Lenhard R E, Order S E, Spunberg J J, Asbell S O, Leibel S A Isotopic immunoglobulin A new systemic therapy for advanced Hodgkin's Disease / *Clin Oncol* 3 1296-1300 (1985)

Maraveyas A, Myers M, Stafford N, Rowlinson-Busza G, Stewart J S W, Epenetos A A Radiolabeled antibody combined with external radiotherapy for the treatment of head and neck cancer Reconstruction of a theoretical phantom of the larynx for radiation dose calculation to local tissues *Cancer Res* 55 1020-1027 (1995a)

Maraveyas A, Stafford N, Rowlinson-Busza G, Stewart J S W, Epenetos A A Pharmacokinetics, biodistribution, and dosimetry of specific and control radiolabeled monoclonal antibodies in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma *Cancer Res* 55 1060-1069 (1995b)

Mulshine J L, Magnani J L, Linnoila R I Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors In: De Vita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.) *Biologic therapy of cancer* IB Lippincott Corp., Philadelphia, 563-588 (1991)

Myklebust AT, Godal A, Jueu S, Pharo A, Fodstad O Comparison of two antibody based methods for elimination of breast cancer cells from human bone marrow *Cancer Res* 54 209-214 (1994)

Nesbit H, Fu Z F, McDonald-Smith J, Steplewski Z, Curtis P J Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from a baculovirus expression system *J Immunol Methods* 151 201-208 (1992)

Perkins A C, Pimm M V A role for gamma scintigraphy in cancer immunology and immunotherapy *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, Neip W B, Krohn K A, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas E D, Bernstein I D Treatment of refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with radiolabeled MB-1 (anti-CD37) antibody *J Clin Oncol* 7 1027-1038 (1989)

Press O W, Eary J F, Appelbaum F R, Martin P J, Neip W B, Glenn S, Fisher D J, Porter B, Matthews D C, Gooley T, Bernstein I D Phase II trial of ¹³¹I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas *Lancet* 346 336-340 (1995)

Quadri S M, Vriesendorp H M, Lechner P K, Williams J R Evaluation of indium-111 and yttrium-90 labeled linker immunoconjugates in nude mice and dogs *Y Med* 34 938-945 (1993)

Reisfeld RA, Gillies SD, Mendelsohn J, Varki NM, Becker JC Involvement of B lymphocytes in the growth inhibition of human pulmonary melanoma metastases in athymic nu/nu mice by an antibody-lymphotoxin fusion protein *Cancer res* 56 1707-1712 (1996)

Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegeler W et al Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma *Lancet* 343 1177-1183 (1994)

Salmi M, Gron-Virta K, Sointu P, Greranan R, Kalimo H, Jalkanen S Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man Down-regulation during malignant transformation of tumors

of squamocellular origin *J Cell Biol* 122 431-442 (1993)

Sambrook J, Fritsch E E, Maniatis T, *Molecular cloning* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)

Schrappe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppel G A, Markowitz D D, Mueller B M, Reisfeld R A Long-term growth suppression of human glioma xenografts by chemimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9 2 27 *Cancer Res* 52 3838-3844 (1992)

Screaton G J R, Bell M V, Jackson D G, Cornelis F B, Gerth U, and Bell J I Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 12160-12164 (1992)

Sears H F, Mattis J, Herlyn D, Hayry P, Atkinson B, Ernst C, Steplewski Z, Koprowski H Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumors *Lancet* 1982 (1) 762-765 (1982)

Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44 *J Exp Med* 177 443-455 (1993)

Senter P D, Schreiber G J, Hirschberg D L, Ashe S A, Hellstrom K E, Hellstrom I Enhancement of the in vitro and in vivo antitumor activities of phosphorylated mitomycin C and etoposide derivatives by monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugates *Cancer Res* 49 5789-5792 (1989)

Shin S-U, Morrison S L Production and properties of chimeric antibody molecules *Methods Enzymol* 178 459-476 (1989)

Siccardi A G, Buraggi G L, Callegaro L, Colella A C, DeFilippi P G et al Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabeled F(ab')₂ fragments of an anti-carcino-embryonic antigen monoclonal antibody a multicenter study *Cancer Res* 49 3095-3103 (1989)

Smith D B, Johnson K S Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase *Gene* 67 31 (1988)

Srivastava S C (Hrsg.) *Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy* Life Sciences Series A /52, Plenum New York (1988)

Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, and Ponta H Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability *Nucleic Acids Res* 21 1225-1229 (1993)

Theuer C P, Kreitman R J, FitzGerald D J, Pastan L Immunotoxins made with a recombinant form of pseudomonas exotoxin A that do not require proteolysis for activity *Cancer Res* 55 340-347 (1993)

Thomas G D, Dykes P W, Bradwell A R Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling In: Catty D (Hrsg.) *Antibodies* Vol. II IRL Press Oxford, 223-244 (1989)

Thompson C H, Stacker S A, Salehi N, Lichtenstein M, Leyden M J, Andrews J T Immunoscintigraphy for detection of lymph node metastasis

ses from breast cancer Lancet 1984 (2) 1245-1247(1984)

Vitetta E S, Thorpe P E Immunotoxins In DeVita V T, Heliman S, Rosenberg S A (Hrsg.) Biologie therapy of cancer J B Lippincott Comp, Philadelphia, 482-495 (1991)

Vitetta E S, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, TIL M, Newman J, Clark P, Collins R, Cun-ningham D, Ghetie V, Uhr J W, Thorpe P E Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma Cancer Res 51 4052-4058 (1991)

Vriesendorp H M, Herbst J M, Germack M A, Klein J L, Lechner P K, Loudenslager D M, Order S E Phase MI studies of yttrium-labeled antiferritin treatment for end stage Hodg-kin's disease, including Radiation Therapy Oncology Group 87-01 J Clin Oncol 9 918-928 (1991)

Vriesendorp H M, Morton J D, Quadri S M Review of five consecutive studies of radio-labeled immunoglobulin therapy in Hodgkins's Disease Cancer Res (Suppl) 55 5888s-5892s (1995)

Wang S-M, Chern J-W, Yeh M-Y, Ng J C, Tung E, Roffler S R Specific activation of glucuronide prod-rugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy Cancer Res 52 4484-4491 (1992)

Weiner L M, ODwyer J, Kitson J, Comis R L, Frankel A E, Bauer R J, Koprad M S, Groves E S Phase I evaluation of an anti-breast carcinoma mono-clonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain im-munoconjugate Cancer Res 49 4062-4067 (1989)

Wilbur, D S, Hadley, S W, Hylandes, M D, Abrams, P G, Beaumier, P A, Morgan, A C, Reno, J M, Fritzberg, A R Development of a stable radioio-dinating agent to label monoclonal antibodies for ra-diotherapy of cancer J Nucl Med 30 216-226 (1989)

Winter, G, Griffith, A D, Hawkins, R E, Hoogenboom, H R Making antibodies by phage dis-play technology Ann Rev Immunol 12, 433-455 (1994)

ПРОТОКОЛ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

(1) ЗАГАЛЬНІ ДАНІ

(1) ЗАЯВНИК

(A) НАЗВА Бюрингер Інгельхайм Інтерна ці она ль Гмбх,

(B) ВУЛИЦЯ Рейнштрассе

(C) МІСТО Інгельхайм

(E) КРАІНА Німеччина

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 55216

(G) ТЕЛЕФОН +49-(0)-6132-772770

(H) ТЕЛЕФАКС +49-(0)-6132-774377

(A) НАЗВА Дослідницький центр Карлсруе Гмбх

(B) ВУЛИЦЯ Поштова скринька 3640

(C) МІСТО Карлсруе

(E) КРАІНА Німеччина

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 76021

(A) ПРИЗВИЩЕ Хайдер, Карл-Хайнц

(B) ВУЛИЦЯ Хервікусгассе 4/3/21

(C) МІСТО Відень

(E) КРАІНА Австрія

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 1120

(A) ПРИЗВИЩЕ Адольф, Гюнттер

(B) ВУЛИЦЯ Штіфтгассе 15-17/10

(C) МІСТО Відень

(E) КРАІНА Австрія

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 1070

(A) ПРИЗВИЩЕ Остерманн, Елінборг

(B) ВУЛИЦЯ Мауербахштр 56/6

(C) МІСТО Відень

(E) КРАІНА Австрія

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 1140

(A) ПРИЗВИЩЕ Парцельт, Ерік

(B) ВУЛИЦЯ Ханс-Бухмюллер-Гассе 8

(C) МІСТО Пуркексдорф

(E) КРАІНА Австрія

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 3002

(A) ПРИЗВИЩЕ Шпротль, Марліз

(B) ВУЛИЦЯ Швенкгассе 3

(C) МІСТО Відень

(E) КРАІНА Австрія

(F) ПОШТОВИЙ ІНДЕКС 1120

(ii) НАЗВА ВИНАХОДУ

Способ діагностики і лікування плоскоклітинно-го раку

(iii) КІЛЬКІСТЬ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ 16

(iv) КОМП'ЮТЕРНА ФОРМА

(A) НОСІЙ ІНФОРМАЦІЇ Гнучкий диск

(B) КОМП'ЮТЕР IBM PC-сумісний

(C) ОПЕРАЦІЙНА СИСТЕМА PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАМНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ Patentn Release #1 0,

Version #1 30 (EPA)

(2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 1

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ

(A) ДОВЖИНА 129 пар основ

(B) ВИД Нуклеотид

(C) ФОРМА обидві

(D) ТОПОЛОГІЯ обидві

(ii) ВИД МОЛЕКУЛИ геном-ДНК

(ix) ОЗНАКИ

(A) НАЗВА/КОД екзон

(B) ПОЛОЖЕННЯ 1 129

(D) ІНШІ ДАНІ

/product= "CD44"

/label= v6

/note= "GenBank data base accession No L05411"

/citation= ([1])

(ix) ОЗНАКИ

(A) НАЗВА/КОД CDS

(B) ПОЛОЖЕННЯ 3 128

(x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ

(A) АВТОРИ Screston, GR

Bell, MV

Jackson, DG

Cornells, FB

Gerth, U

Bell, JI

(B) НАЗВА Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons

(C) ЖУРНАЛ Proc Natl Acad Sci U S A

(D) ТОМ 89

(F) СТОРІНКИ 12160-12164

(G) ДАТА грудень 1992

(K) СУТТЄВІ ЗАЛИШКИ В ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 1 від 1 до 129

(x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ

(H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45 472 3

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (X) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15
 074 4

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
 (X) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 1

TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG AAG AT
 G..n Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Glu Lys
 1 5 10 15

CAG CAG TGG TTT GGC AAC ACA TGG CAT CAG GCA TAT CCA ACA CCA G-
 C..u Glu Thr Phe Gly Asn Arg Thr His C..u Gly T C Ser Glu Thr Pro
 20 25 30

ACA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACC GGG ACA CCT C
 Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala
 35 40 429

(2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 2
 (I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 42 амінокислоти
 (B) ВИД амінокислота

- (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3
 (I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4
 (I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
 (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 8

Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 9
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 10 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3
 (I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
 (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 9
 Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu Gln Trp
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 10
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 11 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ - лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3
 (I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
 (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 10

Thr Ala Thr Gln Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 11
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 14 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4
 (I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996

- (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 11

Cal Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Trp
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 12
 (i) SEQUENZ KENNZEICHEN
 (A) ДОВЖИНА 11 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) STRANGEORM окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17-A-PR-1996
 (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 12

Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 13
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 11 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
 (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 13

Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg Glu Asp Ser
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 14
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 10 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
 (ii) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45472 3

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
 (x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
 (H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15074 4

(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
 (xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 14

Thr Pro Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Gly
 1 5 10

- (2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 15
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
 (A) ДОВЖИНА 42 амінокислот
 (B) ВИД амінокислота
 (C) ФОРМА окрема нитка
 (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна

35

(i) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
(x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
(H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45
472 3
(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
(x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
(H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15
074 4
(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 15

Trp Ala Asp Pro Asn Ser Thr Thr Glu Glu Asn Ala Thr Cln Lys Glu
1 5 10 15

Lys Trp Phe Glu Asn Glu Trp Glu Gly Lys Asn Pro Pro Thr Pro Se
20 25 30

Glu Asn Ser His Val Thr Glu Gly Thr Thr
35 40

(2) ДАНІ ДО ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 16

61065

36

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
(A) ДОВЖИНА 14 амінокислот
(B) ВИД амінокислота
(C) ФОРМА окрема нитка
(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(i) ВИД МОЛЕКУЛИ пептид
(x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
(H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 195 45
472 3
(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 06 грудня 1995
(x) ДАНІ ПРО ПУБЛІКАЦІЮ
(H) РЕЄСТРАЦІЙНИЙ НОМЕР DE 196 15
074 4
(I) ДАТА ПОДАЧІ ЗАЯВКИ 17 квітня 1996
(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 16

Lys Trp Phe Cln Asn Glu Trp Glu Cln Lys Asn Pro Pro Thr
1 5 10

Пептид

Послідовність

Зв'язування

Людина

v6 QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA

BIWA-1

v6A SSTTEETATQK

-

v6B EETATQKEQW

-

v6C TATQKEQWFGN

+/-

v6D QWFGNRWHEGYRQT

+

v6E NRWHEGYRQTP

-

v6F EGYRQTPREDS

-

v6G TPREDSHSTG

-

Пацюк

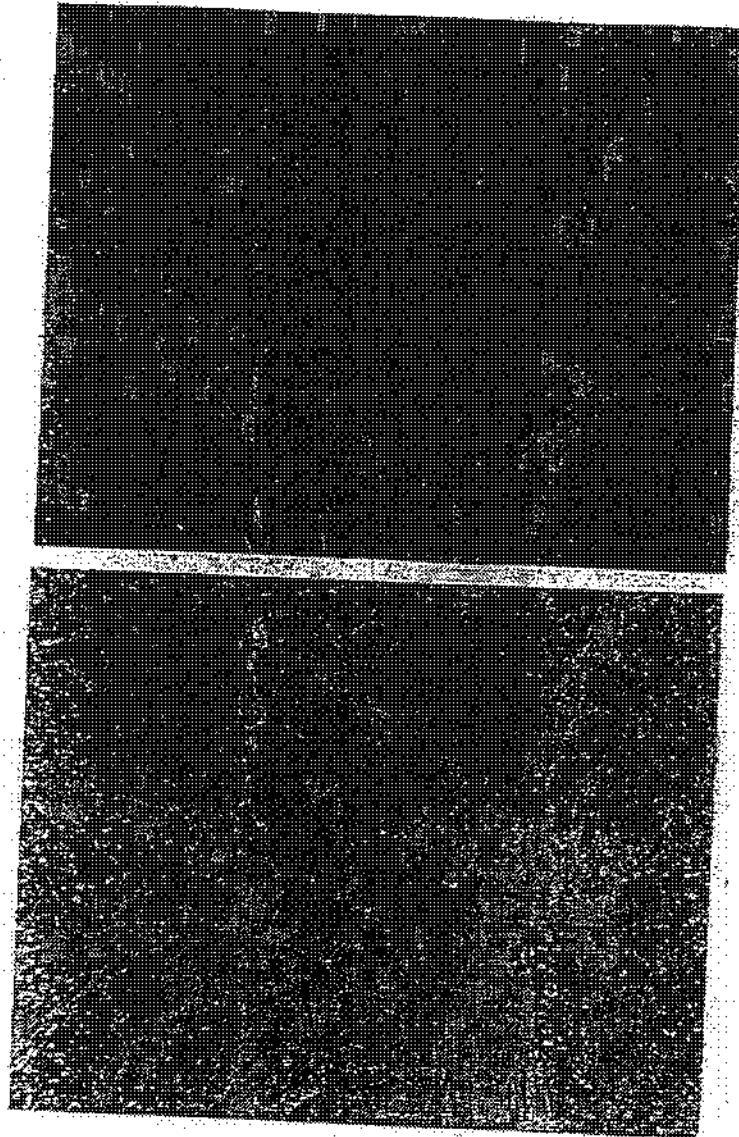
v6 WADPNSTTERAATQKEKWFENWQGNPPTPSEDSHVTEGT T

I.IASML

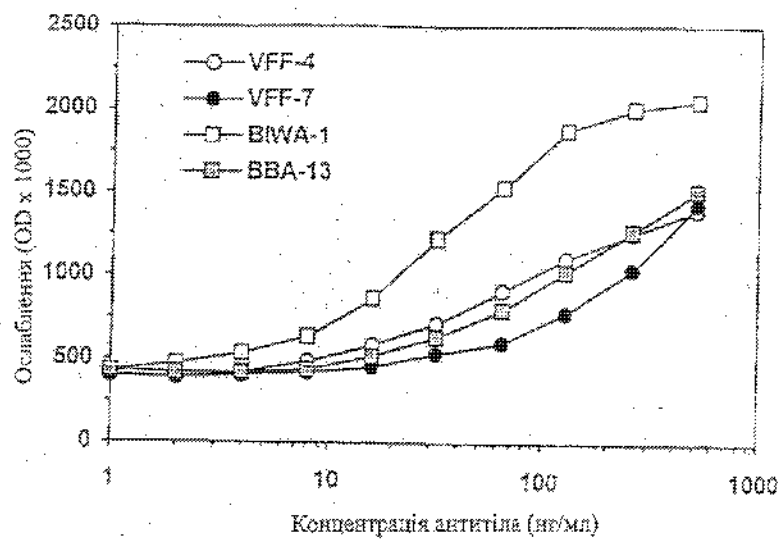
KWFENWQGNPPT

+

Fig. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

3 (13-20)
 4 (18-20)
 5 (19-20)
 6 (19-20)
 7 (19-20)
 8 (20-20)
 9 (20-20)
 10 (20-20)
 11 (20-20)
 12 (20-20)

QWZ GNRWZ EGYRQ
 QWZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ
 WZ GNRWZ EGYRQ

13 (20-20) 14 (20-20) 15 (20-20) 16 (20-20) 17 (20-20) 18 (20-20) 19 (20-20) 20 (20-20) 21 (20-20) 22 (20-20) 23 (20-20) 24 (20-20) 25 (20-20) 26 (20-20) 27 (20-20) 28 (20-20) 29 (20-20) 30 (20-20) 31 (20-20) 32 (20-20) 33 (20-20) 34 (20-20) 35 (20-20) 36 (20-20) 37 (20-20) 38 (20-20) 39 (20-20) 40 (20-20) 41 (20-20) 42 (20-20) 43 (20-20) 44 (20-20) 45 (20-20) 46 (20-20) 47 (20-20) 48 (20-20) 49 (20-20) 50 (20-20) 51 (20-20) 52 (20-20) 53 (20-20) 54 (20-20) 55 (20-20) 56 (20-20) 57 (20-20) 58 (20-20) 59 (20-20) 60 (20-20) 61 (20-20) 62 (20-20) 63 (20-20) 64 (20-20) 65 (20-20) 66 (20-20) 67 (20-20) 68 (20-20) 69 (20-20) 70 (20-20) 71 (20-20) 72 (20-20) 73 (20-20) 74 (20-20) 75 (20-20) 76 (20-20) 77 (20-20) 78 (20-20) 79 (20-20) 80 (20-20) 81 (20-20) 82 (20-20) 83 (20-20) 84 (20-20) 85 (20-20) 86 (20-20) 87 (20-20) 88 (20-20) 89 (20-20) 90 (20-20) 91 (20-20) 92 (20-20) 93 (20-20) 94 (20-20) 95 (20-20) 96 (20-20) 97 (20-20) 98 (20-20) 99 (20-20) 100 (20-20)

Фиг 4

