



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105760** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)

C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00
G01N 33/574 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2010 05531</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.10.2008</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.06.2014</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2007-269470</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 16.10.2007</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: JP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.08.2010, Бюл.№ 15</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2014, Бюл.№ 12</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/JP2008/068794, 16.10.2008</p> <p>(72) Винахідник(и): Камогава Юміко (JP), Намікі Сахорі (JP), То Мінквон (JP), Ісида Кодзі (JP)</p> <p>(73) Власник(и): ЕС-БІ-АЙ БІОТЕХ КО., ЛТД., 1-6-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106-6018, Japan (JP)</p>	<p>(74) Представник: Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: GOTO, T. ET AL.: 'A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells' BLOOD vol. 84, 1994, pages 1922 - 1930. OHTOMO, T. ET AL.: 'Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells' BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. vol. 258, 1999, pages 583 - 591. OZAKI, S. ET AL.: 'Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24' BLOOD vol. 90, 1997, pages 3179 - 3186. ISHIKAWA, J. ET AL.: 'Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth' GENOMICS vol. 26, 1995, pages 527 - 534. KAWAI, SHIGETO ET AL.: 'Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigen in human myeloma xenograft models' ONCOLOGY REPORTS vol. 15, 2006, pages 361 - 367. WO02084290 A1, 24.10.2002 WO02064159 A1, 22.08.2002 WO2005034994 A1, 21.04.2005 WO20057316 A1, 25.07.2002 WO2006013923 A1, 09.02.2006 WO2006054748 A1, 26.05.2006 WO9835698 A1, 20.08.1998 WO9943803 A1, 02.09.1999</p>
--	--

(54) АНТИТИЛО ПРОТИ BST2

(57) Реферат:

UA 105760 C2

Винахід належить до антитіла проти BST2 людини, яке зв'язується з антигеном BST2D людини, що експресується з високими рівнями у ракових клітинах, але по суті не зв'язується з антигеном BST2H людини. Також запропоновано терапевтичні та діагностичні засоби, які включають антитіло цього винаходу, які специфічно виявляють тканини, що експресують BST2D.

Галузь техніки

Цей винахід стосується антитіл, що зв'язуються з антигеном BST2 людини, та їх застосування.

Попередній рівень техніки

Відомо, що BST2 - це трансмембранний глікопротеїн, який експресується з високими рівнями у різних ракових клітинах, включаючи мієлому (непатентні документи 1-4). На цей час повідомлялося, що антиген BST2 включає декілька варіантів сплайсингу (патентні документи 1-5). Також відомо, що з цих варіантів BST2D експресується з високими рівнями у пухлинах (непатентний документ 1). Також відомо, що моноклональне антитіло проти BST2 демонструє цитотоксичність проти клітин внаслідок зв'язування з BST2, що експресується на клітинній поверхні (що відповідає молекулярним видам BST2D) (непатентний документ 2). Крім того, на основі цього принципу були здійснені спроби розробити протипухлинні засоби, які улучають у пухлинні клітини *in vivo*. Наприклад, було продемонстровано, що ці засоби спричиняють найкращий протипухлинний ефект, який, як очікується, зменшить або знешкодить пухлини у модельних мишей, яким пересаджено клітини мієломи людини (непатентні документи 3 та 4).

Патентний документ 1: WO 1999/043803.

Патентний документ 2: WO 1998/035698.

Патентний документ 3: WO 2002/064159.

Патентний документ 4: WO 2005/034994.

Патентний документ 5: WO 2006/008886.

Патентний документ 6: WO 2006/013923.

Непатентний документ 1: Goto T. et al., Blood 84(6): 1922-30, 1994.

Непатентний документ 2: Ohtomo T. et al., Biochem Biophys Res Commun. 258(3): 583-91, 1999.

Непатентний документ 3: Ozaki S. et al., Blood 90(8): 3179-86, 1997.

Непатентний документ 4: Koishihara Y. et al., Blood 92(s): 107, 1998.

Суть винаходу

Задачі, які слід розв'язати цим винаходом

На цей час повідомлялося про декілька варіантів сплайсингу для антигену BST2 людини, які перелічено нижче.

	Нуклеотидна послідовність	Амінокислотна послідовність	Довжина амінокислотної послідовності
BST2D людини	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	(180)
BST2H людини	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	(158)
BST2HS людини	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	(100)

Повідомлялося про спроби, під час яких застосовувалися антитіла, які розпізнають BST2D людини, який є одним з варіантів сплайсингу, для лікування деяких типів пухлин, таких як мієлома. Наприклад, "антитіло проти HM1.24" - це представник моноклонального антитіла проти BST2, яке продемонструвало, що воно є терапевтично ефективним проти мієломи. "Антитіло проти HM1.24" отримали як моноклональне антитіло, застосовуючи клітини мієломи людини як імуноген. Наступний аналіз епітопів виявив, що "антитіло проти HM1.24" розпізнає амінокислоти від позиції 116 до позиції 127 (SEQ ID NO: 24) BST2D людини, наведеного як SEQ ID NO: 2. Амінокислотна послідовність цієї ділянки є спільною з BST2H людини (Фіг. 1).

Антитіло, що має таку специфічність розпізнавання антигену, ймовірно, зв'язується з клітинами та тканинами, що експресують також BST2H. Більш детально, наприклад, діагностичні тести можуть виявляти клітини, що експресують BST2H, окрім пухлин, що експресують BST2D людини. Крім того, оскільки воно також зв'язується з клітинами, що експресують BST2H, концентрація антитіла у крові може знижуватися при терапевтичному застосуванні. Мета цього винаходу - це розв'язання цієї проблеми. Конкретно, завдання цього винаходу - це отримання антитіл, які специфічно зв'язуються з BST2D людини, та їх застосування.

Засоби для розв'язання проблем

Автори цього винаходу вважають, що при введенні людині може виникати неспецифічна адсорбція антитіла проти HM1.24 тканинами, відмінними від пухлин, у тілі людини, та концентрація антитіла у крові може знижуватися. Отже, метою авторів цього винаходу було визначити антитіла, що розпізнають послідовності, відмінні від епітопу, який розпізнається антитілом проти HM1.24. Внаслідок цілеспрямованих дослідів автори цього винаходу зробили

цей винахід.

Більш детально, автори цього винаходу вибрали антитіла BST2, використовуючи зв'язування між антитілом BST2 та різними варіантами сплайсингу антигену BST2 людини як індикатор, та успішно отримали специфічні антитіла проти BST2, що не мають неспецифічної адсорбції з тканинами, які є мішенями лікування або діагностування. Очікується, що застосування цих антитіл запобігає зниженню рівня антитіл у крові після введення. Внаслідок цього, бажані терапевтичні ефекти можна отримати навіть при дозі антитіла, що є нижчою, ніж дози традиційних антитіл. Альтернативно, це антитіло дозволяє здійснювати ефективний діагноз для передбачення терапевтичних ефектів.

Конкретно, цей винахід стосується антитіл проти BST2 людини, способів їх виробництва та їх застосування, як описано нижче:

[1] антитіло проти BST2 людини, яке зв'язується з антигеном BST2D людини, але по суті не зв'язується з антигеном BST2H людини, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[2] антитіло за [1], яке розпізнає поліпептид, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[3] антитіло, отримане із застосуванням як імуногену пептиду, який включає повну амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або принаймні п'ять або більше послідовних амінокислот з SEQ ID NO: 3, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[4] антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом у білку BST2D, що і будь-яке антитіло від [1] до [3], або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[5] антитіло за будь-яким від [1] до [4], яке є моноклональним антитілом, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[6] моноклональне антитіло, яке продукується гібридомою BST2#4LD, депонованою за номером доступу FERM AP-21303, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[7] антитіло за [1], в якому варіабельні ділянки важкого ланцюга та легкого ланцюга включають як CDR1, CDR2 та CDR3 наступні амінокислотні послідовності:

CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SGYYWN (SEQ ID NO: 4);

CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YISYDGSNNYNPSLKNR (SEQ ID NO: 5); та

CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: ILGRGY (SEQ ID NO: 6);

CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 7);

CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: YASNLES (SEQ ID NO: 8); та

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QHSWEIPYT (SEQ ID NO: 9);

або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[8] антитіло за [1], яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO: 11 та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO: 13, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[9] антитіло з заміщенням, делецією, додаванням та/або вставкою однієї або більше амінокислот в антитілі (A) або (B), наведеному нижче, яке має активність, еквівалентну активності антитіла (A) або (B):

(A) антитіло за [1], в якому варіабельні ділянки важкого ланцюга та легкого ланцюга включають як CDR1, CDR2 та CDR3 наступні амінокислотні послідовності:

CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SGYYWN (SEQ ID NO: 4);

CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YISYDGSNNYNPSLKNR (SEQ ID NO: 5); та

CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: ILGRGY (SEQ ID NO: 6);

CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 7);

CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: YASNLES (SEQ ID NO: 8); та

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QHSWEIPYT (SEQ ID NO: 9); або

(B) антитіло, яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO: 11 та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO: 13,

або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[10] антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом у білку BST2D, що і будь-яке антитіло від [7] до [9], або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[11] антитіло за будь-яким від [7] до [10], яке є моноклональним антитілом, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[12] антитіло за будь-яким від [1] до [11], яке має CDC проти клітини, яка експресує антиген BST2D людини на клітинній поверхні, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[13] антитіло за будь-яким від [1] до [11], яке має ADCC проти клітини, яка експресує антиген

BST2D людини на клітинній поверхні, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[14] полінуклеотид, який кодує антитіло за будь-яким від [7] до [9] або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

5 [15] вектор, який є носієм полінуклеотиду, який кодує антитіло за будь-яким від [7] до [9] або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[16] трансформована клітина, сприймаюча вектор за [15] експресувальним чином;

10 [17] спосіб виробництва антитіла за будь-яким від [7] до [9] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, при цьому спосіб включає етапи культивування трансформованої клітини за [16] та збирання з культури антитіла або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[18] гібридома, що продукує антитіло за будь-яким від [1] до [5];

[19] гібридома BST2#4LD, що депонована за номером доступу FERM AP-21303;

15 [20] спосіб виробництва антитіла, який включає етапи культивування гібридоми за [19] та збирання антитіла з культури;

[21] спосіб виробництва специфічного антитіла проти BST2D людини, який включає наступні етапи:

(1) контактування антитіла проти BST2D людини з одним з або з обома BST2H людини та BST2HS людини та

20 (2) збирання, у якості специфічного антитіла проти BST2D людини, антитіла проти BST2D людини, яке має одну з або обидві реакційні специфічності:

(i) не зв'язується з BST2H людини та

(ii) не зв'язується з BST2HS людини;

25 [22] спосіб виробництва специфічного антитіла проти BST2D людини, який включає наступні етапи:

(1) імунізацію тварини, яка не є людиною, пептидом, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або принаймні п'ять або більше послідовних амінокислот, вибраних з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3; та

30 (2) узяття антитіла від тварини за (1), яка не є людиною, або узяття клітин, що продукують антитіло, та збирання антитіла від клітин, що продукують антитіло;

[23] терапевтичний засіб для лікування хвороби, спричиненої зростанням тканини, яка експресує антиген BST2D людини, при цьому терапевтичний засіб включає як активний інгредієнт антитіло за будь-яким від [1] до [13] або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

35 [24] терапевтичний засіб проти пухлини, яка експресує антиген BST2D людини, при цьому терапевтичний засіб включає як активний інгредієнт антитіло за будь-яким від [1] до [13] або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[25] терапевтичний засіб за [24], де пухлина походить з клітини кісткового мозку;

40 [26] терапевтичний засіб за [25], де пухлина, що походить з клітини кісткового мозку, - це мієлома;

[27] терапевтичний засіб за [26], де мієлома - це множинна мієлома;

[28] діагностичний засіб для виявлення тканини, яка експресує антиген BST2D людини, який включає антитіло за будь-яким від [1] до [13] або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

45 [29] діагностичний засіб для виявлення пухлини, яка експресує антиген BST2D людини, який включає антитіло за будь-яким від [1] до [13] або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен;

[30] діагностичний засіб за [29], де пухлина походить з клітини кісткового мозку;

50 [31] діагностичний засіб за [30], де пухлина, що походить з клітини кісткового мозку, - це мієлома;

[32] діагностичний засіб за [31], де мієлома - це множинна мієлома;

[33] спосіб лікування пухлини, що експресує антиген BST2D людини, який включає етап введення антитіла за будь-яким від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен; та

55 [34] застосування антитіла за будь-яким від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, для приготування фармацевтичної композиції для лікування пухлини, що експресує антиген BST2D людини.

60 Альтернативно, цей винахід відноситься до застосування антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, для лікування пухлин, що експресують антиген BST2D людини. Цей винахід також відноситься до

застосування антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, для приготування фармацевтичних композицій для лікування пухлин, що експресують антиген BST2D людини. Крім того, цим винаходом пропонуються способи лікування пухлин, що експресують антиген BST2D людини, при цьому ці способи включають етап введення пацієнтам антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен.

Крім того, цей винахід відноситься до застосування антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, для діагностування пухлин, що експресують антиген BST2D людини. Альтернативно, цей винахід відноситься до застосування антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, що включає антиген-зв'язувальний домен, для виробництва діагностичних засобів для пухлин, що експресують антиген BST2D людини. Цим винаходом також пропонуються способи виявлення пухлин, що експресують антиген BST2D людини у тілі, при цьому ці способи включають етап введення пацієнтам антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен.

Крім того, цим винаходом пропонуються способи приготування фармацевтичних композицій для лікування пухлин, що експресують антиген BST2D людини, при цьому ці способи включають етап змішування антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, з фармацевтично прийнятними носіями. Альтернативно, цей винахід відноситься до способів виробництва діагностичних засобів для виявлення пухлин, що експресують антиген BST2D людини у тілі, при цьому ці способи включають етап змішування антитіла за будь-яким одним від [1] до [13] або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, з фармацевтично прийнятними носіями.

Ефект винаходу

Цим винаходом пропонуються специфічні антитіла проти BST2D людини. Антитіла цього винаходу специфічно зв'язуються з клітинами, що експресують BST2D людини, серед декількох варіантів BST2 людини. Відомо, що BST2 людини включає варіанти сплайсингу, такі як BST2H, але антитіла цього винаходу є по суті нездатними зв'язуватися з клітинами, що експресують BST2H людини. Отже, терапевтичне застосування антитіл цього винаходу може дати терапевтичні ефекти навіть при нижчих дозах. Альтернативно, діагностичне застосування антитіл цього винаходу дозволяє більш специфічно виявляти клітини, що експресують BST2D, такі як клітини мієломи.

Стислий опис ілюстративного матеріалу

Фіг. 1 презентує діаграми, що демонструють білкові структури варіантів сплайсингу BST2.

Фіг. 2 демонструє оцінку специфічності антитіл BST2 людини. Клітинні лінії CHO з примусовою експресією двох варіантів сплайсингу білка BST2 людини, BST2(D) та BST2(H), отримали та оцінили стосовно зв'язування антитіла проти HM1.24 та мишачих антитіл #4LD та #19LD шляхом проточної цитометрії. На цій фігурі зображено результат оцінки.

Фіг. 3 демонструє графіки, на яких зображено результати аналізу CDC (комплементзалежної цитотоксичності) антитіла проти HM1.24 та мишачого антитіла #4LD проти клітин, що експресують BST2. CDC оцінювали із застосуванням BST2(D)-CHO, BST2(H)-CHO та RPMI8226, що походить від мієломи людини. Кількість LDH (лактату дегідрогенази), яка вивільнилася до культурального середовища під час двогодинної інкубації клітин з 0,01-10 мкг/мл антитіла при 37 °C у присутності кролячих комплементів, визначили як цитотоксичність (%).

Фіг. 4 демонструє графік, на якому зображено результати аналізу ADCC (опосередкованої антитілами клітинної цитотоксичності) антитіла проти HM1.24, мишачого антитіла #4LD, химерного антитіла #4LD та мишачого антитіла #19LD проти клітин, що експресують BST2. Клітини-мішені, що застосовувалися у цьому аналізі ADCC, були клітинами BST2(D)-CHO та RPMI8226, та ефекторні клітини були PBMC (мононуклеарами периферійної крові) людини. Кількість витоку LDH до надосадової рідини внаслідок вбивання клітин у діапазоні відношення Е/Т 12,5-100 визначили як ADCC (%). Гуманізоване антитіло проти HM1.24 (АНМ-антитіло) застосовували як контрольне.

Фігура 5 демонструє фотографії, на яких зображено заморожені зрізи тканин селезінки людини, імунологічно забарвлених антитілом #4LD або #19LD.

Фіг. 6 демонструє фотографії, на яких зображено результат вестерн-блотингу, який виявляє рекомбінантний His-мічений білок BST2 людини із застосуванням антитіла #4LD (верхні панелі) або антитіла проти His-мітки (нижні панелі).

Фіг. 7 демонструє графік, на якому зображено зміни об'єму пухлини після введення 4LD модельним мишам, яким було пересаджено клітини лінії RPMI8226. Стрілки вказують на введення антитіла. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою критерію множинного

порівняння за Dunnett із використанням об'єму пухлини, визначеного в останній день вимірювання. **: $P < 0,005$, *: $P < 0,05$.

Фіг. 8 демонструє графік, на якому зображено період виживання модельних мишей, яким вводили 4LD та яким було пересаджено клітини лінії ARH77. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою логарифмічного рангового критерію за способом Kaplan-Meier. *: $P < 0,05$.

Докладний опис винаходу

Приклади варіантів сплайсингу антигену BST2 людини, про які повідомлялося раніше, наведено на Фіг. 1. Амінокислотні послідовності відповідних варіантів предствлені у наступних SEQ ID:

	Нуклеотидна послідовність	Амінокислотна послідовність	Довжина амінокислотної послідовності
BST2D людини	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	(180)
BST2H людини	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	(158)
BST2HS людини	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	(100)

Коли отримують моноклональні антитіла для застосування у цьому винаході, то можна застосовувати імуногенні білки, які включають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, або їх фрагменти. Визначили, що моноклональні антитіла цього винаходу розпізнають ті білки, що включають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 як антиген. Отже, моноклональні антитіла цього винаходу можна отримати, застосовуючи ці білки як імуноген.

Моноклональні антитіла цього винаходу можуть бути фрагментами таких моноклональних антитіл, які включають їх антиген-зв'язувальні домени. Фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен, означає фрагмент, який включає частину, відповідальну за зв'язування антигену з антитілом, та зберігає антиген-зв'язувальну активність. Наприклад, фрагменти антитіла, які включають антиген-зв'язувальний домен, які отримали внаслідок ферментативного перетравлення IgG, можна застосовувати як антитіла цього винаходу. Більш детально, фрагменти антитіла, такі як Fab та $F(ab)_2$, можна отримати внаслідок перетравлення папаїном або пепсином. Відомо, що такі фрагменти антитіла можна застосовувати як молекули антитіла, що мають антиген-зв'язувальну афінність.

Такі фрагменти, які включають антиген-зв'язувальний домен, можна отримати не тільки внаслідок ферментативного розщеплення, але також і за допомогою способів генної інженерії. Наприклад, фрагменти антитіла, які включають антиген-зв'язувальний домен, можна отримати шляхом виділення та експресування гена, що кодує антиген-зв'язувальний домен. Більш детально, антитіла, побудовані шляхом генетичної рекомбінації, можна також застосовувати у цьому винаході доти, доки вони зберігають необхідну антиген-зв'язувальну активність.

Наприклад, такі фрагменти отримують внаслідок ферментативного перетравлення, яким здійснюють розщеплення на специфічній амінокислотній послідовності, яка розпізнається цим ферментом. Альтернативно, за допомогою способів генної інженерії можна отримати фрагменти антитіла так, щоб вони включали будь-яку бажану ділянку антитіла. Отже, фрагменти антитіла, отримані внаслідок розщеплення на ділянці, відмінній від ділянок для фрагментів антитіла, таких як Fab та $F(ab)_2$, також включаються до фрагментів, які включають антиген-зв'язувальний домен антитіла цього винаходу доти, доки вони зберігають антиген-зв'язувальну активність. Крім того, до антитіл цього винаходу також включаються молекули антитіла зі зміненими формами, які отримано шляхом повторного з'єднання фрагмента, що включає антиген-зв'язувальний домен, з константною ділянкою. Отже, антитіла, отримані внаслідок генетичної рекомбінації, включають, наприклад, химерні антитіла, антитіла з пересадженням CDR, Fv з єдиним ланцюгом, діатіла, лінеаризовані антитіла та багато-специфічні антитіла, отримані з фрагментів антитіла. Такі антитіла можна отримати з моноклональних антитіл або клітин, що їх продукують, за допомогою відомих способів.

Відомими є підкласи антитіл з сильною ефекторною активністю. Отже, терапевтичний ефект химерних антитіл або антитіл з пересадженими CDR цього винаходу можна далі підвищити шляхом вибору підкласів з найкращою ефекторною активністю.

Білки, що включають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, можна отримати як рекомбінант. Наприклад, нуклеотидна послідовність SEQ ID NO: 1 кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. Отже, ДНК, що включає таку нуклеотидну послідовність, можна експресувати шляхом застосування відповідного вектора та хазіяна, щоб отримати бажаний білок. Альтернативно, можна застосовувати як імуноген олігопептид, який включає амінокислотну послідовність, що містить послідовні амінокислоти, вибрані з амінокислотної

послідовності SEQ ID NO: 2. Амінокислотна послідовність, яку слід вибрати як імуноген, включає, наприклад, 7-50 амінокислот, переважно приблизно 5-20 амінокислот.

Як імуноген у цьому винаході особливо переважний олігопептид включає амінокислотну послідовність, вибрану з BST2D-специфічної послідовності людини (SEQ ID NO: 3). Людська BST2D-специфічна послідовність означає амінокислотну послідовність, яка є специфічною до амінокислотної послідовності BST2D (SEQ ID NO: 2) та яку не знаходять в амінокислотних послідовностях інших варіантів сплайсингу BST2, конкретно, в амінокислотних послідовностях BST2H (SEQ ID NO: 21) та BST2HS (SEQ ID NO: 23). Більш детально, олігопептиди, які включають амінокислотну послідовність з принаймні п'яти або більше послідовних амінокислот, вибраних з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3 (19 залишків), служать як переважний імуноген для отримання людських BST2D-специфічних антитіл цього винаходу. Пептид, який слід застосовувати як імуноген, може включати додаткову амінокислотну послідовність окрім амінокислотної послідовності, вибраної з BST2D, доки вона може індукувати BST2D-специфічне антитіло. Конкретно, цей винахід стосується способів виробництва специфічних антитіл проти людського BST2D, при цьому ці способи включають етапи:

(1) імунізації тварини, яка не є людиною, пептидом, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або амінокислотну послідовність, яка включає принаймні п'ять або більше послідовних амінокислот, вибраних з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3; та

(2) узяття антитіла від тварини за (1), яка не є людиною, або узяття клітин, що продукують антитіла, від цієї тварини та збирання антитіла від клітин, що продукують антитіла.

BST2D-специфічну послідовність людини (SEQ ID NO: 3) ідентифікували на основі множинного порівняльного аналізу первинної структури амінокислотних послідовностей білків BST2D, BST2H та BST2HS, застосовуючи алгоритм ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>). С-кінець зрілого білка BST2D передбачили завдяки застосуванню програми передбачення сайту модифікації GPI ((1) GPI modification site prediction: http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html; (2) DGPI: http://129.194.185.165/dgpi/DGPI_demo_en.html; та (3) GPI-SOM: <http://gpi.unibe.ch/>).

Відомими є способи отримання олігопептидів, що включають довільні амінокислотні послідовності. Олігопептиди, що включають бажану амінокислотну послідовність, можна отримати, наприклад, шляхом хімічного з'єднання амінокислот. Альтернативно, фрагменти, що включають певну амінокислотну послідовність, можна також отримати шляхом розщеплення рекомбінантних білків, які включають амінокислотну послідовність повної довжини та які отримано, як описано вище. Імуногенність отриманих олігопептидів можна підвищити шляхом зв'язування їх з відповідними білками-носіями. Як білки-носії можна застосовувати гемоціанін молюска *Fissurella* (або *Diodora*) apertura, альбумін бичачої сироватки та їм подібне.

На наступному етапі відповідних тварин імунізують імуногеном. Білок SEQ ID NO: 2 або пептид, що включає його часткову амінокислотну послідовність, можна вводити тваринам, яких слід імунізувати, разом з ад'ювантом.

Крім того, трансформовані клітини, які є носіями та які є здатними експресувати ДНК, що кодують амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, можна також застосовувати як імуноген, та переважними є, наприклад, ДНК, які включають нуклеотидну послідовність, яка складає кодувальну ділянку нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1. Трансформовані клітини, що є корисними як імуноген, можна отримати шляхом вставки ДНК у відповідний вектор експресії та трансформування клітин-хазяїнів цим конструктом.

Такі клітини-хазяїни для застосування як імуногену можуть походити від таких самих тваринних видів, що і тварина, яку слід імунізувати. Імунні реакції, що є специфічними для сторонніх білків, можна індукувати, застосовуючи клітини від таких самих видів. Наприклад, коли щурів застосовують як тварину, яку слід імунізувати, можна застосовувати клітини-хазяїни, що походять від щурів. Як імуноген можна також застосовувати фракції трансформованих клітин, які включають вищезгадані білки. Як показано у розділі "Приклади", трансмембранний домен знаходиться в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2 (трансмембранна ділянка наведена на Фіг. 1). Отже, білки, що включають цю амінокислотну послідовність, можуть експресуватися на клітинних мембранах. Отже, як імуноген можна застосовувати мембранні фракції клітин, що експресують вищезгадані білки.

Як показано на Фіг. 1, зовнішньоклітинний домен BST2D є представленим на поверхні клітин, що експресують BST2D. Цей домен також містить структуру, яка є спільною з іншими варіантами BST2. Отже, антитіла, які зв'язуються з варіантами, відмінними від BST2D, можна генерувати, коли клітини, що експресують BST2D, застосовуються як імуноген. Проте, бажане антитіло можна отримати за допомогою відбору антитіла із застосуванням специфічності зв'язування з кожним варіантом як індикатора. Конкретно, цим винаходом пропонуються способи виробництва специфічних антитіл проти людського BST2D, які включають етапи:

(1) контактування антитіла проти BST2D людини з одним з або обома BST2H людини та BST2HS людини та

(2) збирання специфічного антитіла проти BST2D людини, отримання антитіла проти BST2D людини, що має одну з або обидві реакційні специфічності:

5 (i) є нездатним зв'язуватися з BST2H людини та

(ii) є нездатним зв'язуватися з BST2HS людини.

Специфічність реакції між антитілом та кожним варіантом можна піддати тестуванню згідно зі способом, описаним далі.

10 Будь-яку хребетну тварину, яка не є людиною, можна застосовувати як тварину, яку слід імунізувати згідно з цим винаходом. Коли слід отримати моноклональні антитіла, тоді переважно застосовувати тварин, для яких можна легко отримати партнера для злиття гібридом. Наприклад, гібридами отримали, застосовуючи клітини, що походять від мишей, щурів, кролів, биків, козлів та їм подібних. Такі тварини можна застосовувати для імунізації у цьому винаході. Ад'юванти включають, наприклад, повний ад'ювант Фрейнда та неповний ад'ювант Фрейнда.

15 Тварин імунізують багато разів з триденними - десятиденними інтервалами. При кожній імунізації можна застосовувати довільну кількість трансформованих клітин. При кожній імунізації застосовують зазвичай від 10^3 до 10^8 трансформованих клітин, наприклад, 10^6 трансформованих клітин. Альтернативно, від 1 до 100 мкг зазвичай застосовується при імунізації білком або пептидом. Моноклональні антитіла цього винаходу можна отримати шляхом узяття імунокомпетентних клітин від тварин, яких імунізували декілька разів, а потім шляхом клонування клітин, які виробляють бажані антитіла. Термін "імунокомпетентні клітини" означає клітини зі здатністю виробляти антитіла в імунних тваринах. Такі імунокомпетентні клітини можна клонувати, наприклад, за допомогою способів гібридом. Єдина імунокомпетентна клітина виробляє єдиний тип антитіла. Отже, моноклональні антитіла можна отримати, коли можна отримати (клонувати) популяцію клітин, що походить від єдиної клітини. Способи гібридом означають способи, які включають іморталізацію імунокомпетентних клітин внаслідок злиття з відповідною клітинною лінією з наступним клонуванням. Відомо багато клітинних ліній, що є корисними у способах гібридом. Такі клітинні лінії мають найкращу ефективність іморталізації для лімфоцитних клітин та включають різні генетичні маркери, які є необхідними для відбору клітин, злиття яких було успішним. Крім того, коли слід отримати клітини, що виробляють антитіла, можна застосовувати клітинні лінії, що не мають здатності виробляти антитіла.

20 Наприклад, мишача міелома P3 × 63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) - це клітинна лінія, яка звичайно застосовується та яка є корисною у способах злиття клітин для клітин мишей та щурів. Гібридами зазвичай отримують шляхом злиття клітин від однакових видів; проте, моноклональні антитіла можна також отримати з гетеро-гібридом між спорідненими, проте різними видами.

25 Специфічні протоколи для злиття клітин є відомими. Більш детально, імунокомпетентні клітини від імунних тварин поєднують з відповідними партнерами для злиття, щоб здійснити злиття клітин. Імунокомпетентні клітини включають клітини селезінки та В-клітини периферійної крові. Як партнери для злиття можна застосовувати різні клітинні лінії, описані вище. Щоб здійснити злиття клітин можна застосовувати спосіб з використанням поліетиленгліколю та способу електрозлиття.

30 Потім клітини, які успішно злилися, вибирають із застосуванням маркерів селекції, включених у злиті клітини. Наприклад, коли для злиття клітин застосовуються НАТ-чутливі клітинні лінії, клітини, що успішно злилися вибирають шляхом відбору клітин, які зростають у середовищі НАТ (гіпоксантин-аміноптерин-тимідиновому середовищі). Потім слід переконаватися, що антитіла, які продукуються вибраними клітинами, мають бажану реактивність.

35 Кожну гібридому піддають скринінгу на основі реактивності антитіла. Більш детально, вибираються гібридами, які продукують моноклональне антитіло проти BST2D людини, яке не розпізнає епітоп з амінокислотних позицій від 116 до 127 (SEQ ID NO: 24) у BST2D людини SEQ ID NO: 2. При селекції гібридом антитіла, що продукуються гібридомами, тестують стосовно їх зв'язування з антигеном BST2D людини, а потім стосовно відсутності у них здатності розпізнавати епітоп SEQ ID NO: 24 як сайт зв'язування. У цьому винаході "відсутність здатності розпізнавати епітоп" або "відсутність здатності розпізнавати епітоп як сайт зв'язування" можна піддати тестуванню шляхом оцінювання активності зв'язування з поліпептидом, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24, за допомогою способу, описаного нижче.

40 Більш детально, способи оцінювання активності зв'язування з поліпептидом, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24, включають відповідні способи, які є добре відомими для фахівців у галузі, такі як твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA),

радіоімуноаналіз (RIA), ферментний імуноаналіз (EIA) та проточна цитометрія (FACS).

Більш детально, такі способи включають, наприклад, способи тестування відсутності здатності зв'язуватися з BST2H або способи тестування активності зв'язування з BST2HS. У способах, що застосовують ELISA з міченим ферментом антитілом, антигени BST2D або BST2H іммобілізують на відповідній твердій фазі; а потім моноклональне антитіло, зв'язане з антигеном, виявляють за допомогою міченого антитіла, яке розпізнає імуноглобулін імунізованої тварини. Гібридами, що продукують моноклональне антитіло, можна піддавати швидкому скринінгу за допомогою ELISA, застосовуючи при цьому мікропланшети із закріпленими антигенами BST2D або BST2H на їхніх внутрішній стінках. Після цього гібридами оцінюють за допомогою такої ж самої процедури, що і аналіз ELISA, стосовно їх активності зв'язуватися із закріпленими на відповідній твердій фазі BST2H. Гібридами, що продукують моноклональне антитіло з бажаною зв'язувальною активністю, можна вибрати за моноклональними антитілами, які зв'язуються з антигеном BST2D, за допомогою цього способу ELISA.

Антитіла, які зв'язуються з BST2D людини, але є по суті нездатними зв'язуватися з BST2H людини, можна вибрати так, як описано вище. Більш детально, як застосовується у цьому описі винаходу, термін "антитіло, що є по суті нездатним зв'язуватися з BST2H людини" означає антитіло, що є по суті нездатним зв'язуватися з клітинами, що експресують BST2H людини. Чи є антитіло по суті нездатним зв'язуватися з клітинами, що експресують BST2H людини, можна визначити згідно зі способом, описаним далі.

Коли підтверджується, що вибрана гібридома продукує бажане антитіло внаслідок переважного субклонування, її можна вибрати як гібридому, що продукує моноклональне антитіло цього винаходу. Способи вимірювання та оцінювання антиген-зв'язувальної активності антитіла включають вищеописаний ELISA та інші відповідні способи, такі як FACS. Способи, що застосовують FACS, є особливо придатними для вимірювання та оцінювання зв'язування антитіла з антигеном, що експресується на поверхні клітин, суспендованих у буфері або йому подібному. Проточні цитометри, що застосовуються у способах FACS, включають, наприклад, наступні відомі пристрої:

FACSCanto™ II,
FACSAria™
FACSArray™,
FACSVantage™ SE,
FACSCalibur™ - усі є назвами продуктів BD Biosciences;
EPICS ALTRA HyPerSort,
Cytomics FC 500,
EPICS XL-MCL ADC, EPICS XL ADC,
Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC - усі є назвами продуктів Beckman Coulter.

Переважає способи вимірювання антиген-зв'язувальної активності антитіла проти BST2D включають, наприклад, спосіб, описаний нижче. По-перше, випробовуване антитіло піддають реакції з клітинами, що експресують BST2D, BST2H або BST2HS, та випробовуване антитіло забарвлюють FITC-міченим вторинним антитілом, яке розпізнає його. Потім визначають інтенсивність флуоресцентності та кількість клітин за допомогою FACSCalibur (BD Biosciences). Кількість антитіла, зв'язаного з клітинами, відбивається в інтенсивності флуоресцентності (тобто, середнього геометричного значення), отриманої внаслідок аналізу із застосуванням CELL QUEST Software (BD Biosciences). Більш детально, зв'язувальну активність антитіла, яку представлено як кількість зв'язаного антитіла, можна оцінити шляхом визначення середнього геометричного значення.

У цьому способі, чи є антитіло "по суті нездатним зв'язуватися з клітинами, що експресують BST2H", можна оцінити, наприклад, згідно зі способом, описаним нижче. По-перше, випробовуване антитіло, зв'язане з клітинами, що експресують молекулу BST2H, забарвлюють вторинним антитілом. Наприклад, коли випробовуване антитіло є мишачим антитілом, тоді FITC-мічене антитіло проти мишачого імуноглобуліну можна застосовувати як вторинне антитіло. Потім визначають інтенсивність флуоресцентності на клітинах. Коли FACSCalibur застосовується у проточній цитометрії для виявлення флуоресцентності, тоді отриману інтенсивність флуоресцентності можна проаналізувати, застосовуючи CELL QUEST Software. З середніх геометричних значень (Geo-Mean) у присутності та відсутності випробовуваного антитіла розраховують відношення (Δ Geo-Mean) за формулою, наведеною нижче. З цього відношення можна визначити відсоткове підвищення інтенсивності флуоресцентності, отриманої внаслідок зв'язування випробовуваного антитіла.

$$(\Delta \text{Geo-Mean}) = [(\text{Geo-Mean, у присутності випробовуваного антитіла})] / [(\text{Geo-Mean, у відсутності випробовуваного антитіла})].$$

Середнє геометричне значення (значення $\Delta\text{Geo-Mean}$ для BST2H), визначене внаслідок цього аналізу, яке відбиває кількість випробовуваного антитіла, зв'язаного з клітинами, що експресують BST2H, порівнюють зі значенням відношення $\Delta\text{Geo-Mean}$, яке відбиває кількість випробовуваного антитіла, зв'язаного з клітинами, що експресують BST2D або BST2H. Антитіло проти HM1.24 можна застосовувати як контрольне антитіло.

У цьому винаході передбачається, що випробовуване антитіло є "по суті нездатним зв'язуватися з клітинами, що експресують BST2H", коли значення $\Delta\text{Geo-Mean}$ випробовуваного антитіла при зв'язуванні з клітинами, що експресують BST2H, максимально становить 50 %, переважно 30 %, більш переважно 20 %, іще більш переважно менш ніж 10 % від значення $\Delta\text{Geo-Mean}$ випробовуваного антитіла при зв'язуванні з клітинами, що експресують BST2D або BST2HS. Формулу для визначення середнього геометричного значення (Geo-Mean) описано в інструкції користувача CELL QUEST Software (BD Biosciences). Активність зв'язування з клітинами, що експресують BST2H, можна оцінити таким самим способом. Коли клітини, що експресують молекулу BST2HS, BST2H або BST2D, застосовуються для оцінки відомої зв'язувальної активності, тоді переважно, щоб кожну з них отримували із застосуванням такого ж самого вектора експресії та клітин-хазяїнів та щоб рівні експресії у відповідних клітинах були б порівнянними один з одним.

Моноклональні антитіла цього винаходу включають моноклональні антитіла, які зв'язуються з клітинами, що експресують BST2D, та активність яких стосовно зв'язування з клітинами, що експресують молекулу BST2H, є більш низькою порівняно з активністю зв'язування з клітинами, що експресують BST2D. Альтернативно, переважні моноклональні антитіла цього винаходу включають моноклональні антитіла, які зв'язуються з клітинами, що експресують BST2D, але є по суті нездатними зв'язуватися з клітинами, що експресують молекулу BST2H.

Крім того, цим винаходом пропонуються антитіла, які зв'язуються з такими ж самими епітопами, що і моноклональні антитіла, описані у цьому описі винаходу. Конкретно, цей винахід стосується антитіл, які розпізнають такі ж самі епітопи, що і моноклональні антитіла цього винаходу, та їх застосування. Наприклад, 4LD, яке є переважним моноклональним антитілом цього винаходу, розпізнає як епітоп амінокислотну послідовність EVERLRRENQVLSVR, приведену у SEQ ID NO: 37. Більш детально, синтетичні пептиди, які складаються з послідовності послідовних амінокислот, вибраних з амінокислотної послідовності (47-180), яка складає зовнішньоклітинний домен в амінокислотній послідовності повного BST2D людини, приведеного у SEQ ID NO: 2, K(47)---R(147), розпізнаються антитілом цього винаходу 4LD, але зв'язування антитіла 4LD з K(47)---V(146) неможна виявити за такими ж самими умовами. Альтернативно, E(133)---Q(180) розпізнається антитілом цього винаходу 4LD, але зв'язування антитіла 4LD з V(134)---Q(180) неможна виявити за такими ж самими умовами.

Отже, моноклональні антитіла, які розпізнають епітоп, який складається з EVERLRRENQVLSVR SEQ ID NO: 37, є переважними моноклональними антитілами цього винаходу. Більш детально, з синтетичних пептидів, які складаються з послідовності послідовних амінокислот, вибраних з амінокислотної послідовності (47-180), яка складає зовнішньоклітинний домен в амінокислотній послідовності повного BST2D людини, приведеного у SEQ ID NO: 2, антитіла, які зв'язуються з пептидом, який складається з K(47)---R(147) або E(133)---Q(180), та зв'язування яких з K(47)---V(146) та V(134)---Q(180) неможна виявити за такими ж самими умовами, є переважними антитілами BST2D цього винаходу. Такі антитіла можна отримати, наприклад, згідно зі способами, описаними нижче.

Чи зв'язується випробовуване антитіло з таким самим епітопом, що і відмінне антитіло, а саме, чи має випробовуване антитіло такий самий епітоп, що є спільним з відмінним антитілом, можна визначити шляхом оцінювання конкуренції цих двох при зв'язуванні з таким самим епітопом. У цьому винаході конкуренцію між антитілами можна помітити за допомогою FACS, аналізу перехресного блокування або їм подібного. При FACS, по-перше, сигнали флуоресцентності вимірюються після зв'язування моноклональних антитіл цього винаходу з клітинами, що експресують BST2D. Потім після реакції антитіла-конкурента, яке є кандидатом, такі ж самі клітини піддають реакції з моноклональними антитілами цього винаходу та аналізують шляхом FACS із застосуванням такого ж самого способу. Альтернативно, моноклональні антитіла цього винаходу та випробовуване антитіло-конкурент можуть одночасно реагувати з одними й тими ж клітинами. Коли результат аналізу FACS моноклонального антитіла цього винаходу змінюється після додавання антитіла-конкурента, тоді антитіло-конкурент та моноклональне антитіло цього винаходу оцінюються як такі, що розпізнають один і той же епітоп.

Крім того, наприклад, конкурентний ELISA - це переважний аналіз перехресного блокування. Більш детально, при аналізі перехресного блокування клітини, що експресують BST2D,

імобілізують на комірках титраційного мікропланшета. Після попередньої інкубації у присутності або відсутності конкурентного антитіла-кандидата додають моноклональні антитіла цього винаходу. Кількість моноклонального антитіла цього винаходу, зв'язаного з клітинами, що експресують BST2D у комірці, зворотно корелюється зі зв'язувальною активністю конкурентного антитіла-кандидата (випробовуваного антитіла), яке конкурентно зв'язується з тим же самим епітопом. Більш детально, чим більш високу спорідненість має випробовуване антитіло стосовно такого ж самого епітопу, тим меншою є кількість зв'язування моноклонального антитіла цього винаходу з імобілізованими у комірках клітинами, що експресують білок BST2D. Навпаки, чим більш високу спорідненість випробовуване антитіло має стосовно такого ж самого епітопу, тим більшою є кількість зв'язування випробовуваного антитіла з імобілізованими у комірках клітинами, що експресують білок BST2D.

Кількість антитіла, зв'язаного з коміркою, можна легко визначити за допомогою попереднього мічення цього антитіла. Наприклад, мічене біотином антитіло можна виміряти, застосовуючи кон'югат авідин-пероксидази та відповідний субстрат. Зокрема, аналіз перехресного блокування, при якому застосовуються ферментні мітки, такі як пероксидаза, називається "конкурентним ELISA". Антитіла можна мітити іншими речовинами для мічення, які сприяють виявленню та вимірюванню. Конкретно, відомими є радіоактивні мітки та флуоресцентні мітки.

Альтернативно, коли випробовуване антитіло включає константну ділянку, що походить зі зразка, відмінного від зразка моноклонального антитіла цього винаходу, тоді будь-яке антитіло можна вимірити міченим антитілом, яке специфічно розпізнає константну ділянку, що походить з одного зі зразків. Альтернативно, коли антитіла походять з одного й того ж зразка, але класи цих антитіл є різними, тоді антитіло, зв'язане з коміркою, можна вимірити, застосовуючи антитіла, які специфічно розпізнають будь-який з цих класів.

Коли антитіло-кандидат блокує принаймні 20 %, переважно принаймні від 20 до 50 %, а більш переважно щонайменше 50 % зв'язування моноклонального антитіла цього винаходу порівняно зі зв'язувальною активністю, визначеною у контрольному тесті, що здійснюється у відсутності конкурентного антитіла-кандидата, тоді конкурентне антитіло-кандидат зв'язується з по суті таким самим епітопом, що і моноклональне антитіло цього винаходу, або конкурентно зв'язується з таким самим епітопом.

Антитіла, що зв'язуються з таким самим епітопом, що і моноклональне антитіло, включають, наприклад, антитіла [4] та [10], описані вище.

Як описано вище, антитіла [4] та [10] включають не тільки одновалентні, але також багатовалентні антитіла. Багатовалентні антитіла цього винаходу включають багатовалентні антитіла, у яких усі антиген-зв'язувальні домени є однаковими, та багатовалентні антитіла, у яких деякі або усі антиген-зв'язувальні домени є відмінними між собою.

Будь-яке антитіло, що розпізнає BST2D, можна застосовувати як антитіло цього винаходу. Переважні антитіла включають, наприклад, антитіла від (1) до (5), описані нижче. Ці антитіла можуть бути, наприклад, повними антитілами, мінітілами, антитілами тварин, химерними антитілами, гуманізованими антитілами або антитілами людини.

(1) Антитіло, у якому варіабельні ділянки важкого ланцюга та легкого ланцюга включають як CDR1, CDR2 та CDR3 наступні амінокислотні послідовності, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен:

CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SGYYWN (SEQ ID NO: 4);

CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YISYDGSNNYNPSLKNR (SEQ ID NO: 5); та

CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: ILGRGY (SEQ ID NO: 6);

CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 7);

CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: YASNLES (SEQ ID NO: 8); та

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QHSWEIPYT (SEQ ID NO: 9).

(2) Антитіло за (1), яке включає амінокислотні послідовності, описані нижче як варіабельні ділянки важкого ланцюга та легкого ланцюга, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен:

варіабельна ділянка важкого ланцюга SEQ ID NO: 11 та варіабельна ділянка легкого ланцюга SEQ ID NO: 13.

(3) Антитіло, отримане внаслідок заміщення, делеції, додавання та/або вставки однієї або більше амінокислот в антитілі (1) або (2), яке має еквівалентну активність, що і антитіло (1) або (2).

(4) Антитіло, що зв'язується з таким самим епітопом у білку BST2D, що і антитіло за будь-яким одним від (1) до (3), або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен.

(5) Антитіло за будь-яким одним від (1) до (5), яке є моноклональним антитілом, або його

фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен.

Переважний варіант здійснення антитіла за (3), описаного вище, - це антитіла без зміни в їхніх CDR. З антитіл за (3), описаних вище, переважний варіант здійснення "антитіла, отриманого внаслідок заміщення, делеції, додавання та/або вставки однієї або більше амінокислот в антитілі за (1), яке має еквівалентну активність, що і антитіло за (1)", - це, наприклад, "антитіла, отримані внаслідок заміщення, делеції, додавання та/або вставки однієї або більше амінокислот в антитілі за (1), яке має еквівалентну активність, що і антитіло за (1), та важкий ланцюг якого включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 як CDR1, амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5 як CDR2 та амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6 як CDR3, та легкий ланцюг якого включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 як CDR1, амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8 як CDR2 та амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9 як CDR3". З антитіл за (3), описаних вище, переважні варіанти здійснення інших антитіл можна представити таким самим чином.

У цьому описі винаходу "антитіло, що має еквівалентну активність" означає "функціонально еквівалентне антитіло". "Еквівалентна активність" або "еквівалентна функція" означає, наприклад, що BST2D- або BST2H-зв'язувальна активність, спорідненість стосовно BST2D або BST2H або комплементзалежна цитотоксичність (CDC) або опосередкована антитілами клітинна цитотоксичність (ADCC) проти клітин, що експресують білок BST2D, є однаковими між антитілами.

Способи введення мутацій у поліпептиди є відомими для фахівців у галузі, та вони включені до способів отримання поліпептидів, які є функціонально еквівалентними до поліпептиду. Наприклад, фахівці у галузі можуть отримати антитіло, яке є функціонально еквівалентним до антитіла цього винаходу, шляхом введення відповідних мутацій в антитіло за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W, and Fritz HJ (1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492; та Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766). Альтернативно, амінокислотні мутації можуть виникати природно. Антитіла, які є функціонально еквівалентними до антитіл цього винаходу та які включають амінокислотну послідовність, яка включає мутацію однієї або більше амінокислот в амінокислотній послідовності антитіла цього винаходу, також включено до антитіл цього винаходу.

У таких мутантах кількість амінокислот, що мутуються, становить зазвичай 50 амінокислот або менше, переважно 30 амінокислот або менше, а більш переважно 10 амінокислот або менше (наприклад, 5 амінокислот або менше).

Амінокислотний залишок переважно мутує в залишок, який зберігає властивості амінокислотного бічного ланцюга. Наприклад, на підставі властивостей їхніх бічних ланцюгів амінокислоти класифікують на:

гідрофобні амінокислоти (A, I, L, M, F, P, W, Y та V);

гідрофільні амінокислоти (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S та T);

амінокислоти, що мають аліфатичні бічні ланцюги (G, A, V, L, I та P);

амінокислоти, що мають бічні ланцюги, які містять гідроксильну групу (S, T та Y);

амінокислоти, що мають бічні ланцюги, які містять атом сірки (C та M);

амінокислоти, що мають бічні ланцюги, які містять карбонову кислоту та амід (D, N, E та Q);

бічні ланцюги, які містять основу (R, K та H), та

амінокислоти, що мають ароматичновмісні бічні ланцюги (H, F, Y та W).

(Літери у дужках вказують на однолітерні коди амінокислот).

Відомо, що поліпептиди, які включають модифіковану амінокислотну послідовність, отриману внаслідок делеції, додавання та/або заміщення одного або більше амінокислотних залишків в амінокислотній послідовності, зберігають первинну біологічну активність (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M. J. and Smith, M., *Nucleic Acids Research* (1982) 10, 6487-6500; Wang, A. et al., *Science* 224, 1431-1433; та Dalbadie-McFarland, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79, 6409-6413). Більш детально, активність поліпептиду зазвичай ймовірно зберігається в амінокислотній послідовності, яка складає поліпептид, коли амінокислотне заміщення відбувається між амінокислотами, які відносяться до однієї групи. У цьому описі винаходу таке заміщення між амінокислотами у межах амінокислотної групи називається консервативним заміщенням.

У цьому винаході рекомбінантні антитіла, що продукуються за допомогою способів генної інженерії, можна застосовувати як антитіло цього винаходу. Щоб отримати рекомбінантні антитіла, гени антитіла вставляються у відповідні вектори, а потім вводяться у хазяїнів (дивись, наприклад, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL*

ANTIBODIES, опубліковано в Сполученому Королівстві MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Більш детально, таке антитіло може експресуватися завдяки виділенню кДНК, яка кодує антиген-зв'язувальний домен антитіла, з гібридами та вставки цієї кДНК у відповідний вектор експресії. Відомими є способи отримання кДНК, які кодують варіабельні ділянки антитіла, та вставки їх у вектори експресії з наступним перетворенням відповідних клітин-хазяїнів цими векторами та експресуванням антитіла. Відомими також є способи отримання химерних антитіл шляхом зшивання варіабельних ділянок, що містять антиген-зв'язувальні домени, з константними ділянками.

Цим винаходом також пропонуються клітини-хазяїни, в які введені вектори цього винаходу. Клітини-хазяїни, до яких вводяться вектори цього винаходу, особливо не обмежуються, та можна застосовувати, наприклад, *Escherichia coli* та різні типи тваринних клітин. Клітини-хазяїни цього винаходу можна застосовувати, наприклад, як систему виробництва для експресування та продукування антитіл цього винаходу. Системи для виробництва поліпептидів включають виробничі системи *in vitro* та *in vivo*. Виробничі системи *in vitro* включають виробничі системи, що застосовують еукаріотні або прокаріотні клітини.

Коли застосовуються еукаріотні клітини, тоді можна застосовувати як хазяїнів, наприклад, тваринні клітини, рослинні клітини та клітини грибів. Такі тваринні клітини включають клітини ссавців (наприклад, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), COS, NIH3T3, клітини мієломи, клітини нирки дитини хом'ячка (BHK), HeLa та Vero), клітини амфібій (наприклад, ооцит *Xenopus* (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)) та клітини комах (наприклад, Sf9, Sf21 та Tn5). Серед клітин CHO особливо переважними є ті клітини CHO, що мають дефіцит гена DHFR, dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 4216-4220) та CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60: 1275). Клітини CHO застосовуються особливо переважно для великомасштабної експресії у тваринних клітинах. Вектори можна ввести до клітин-хазяїнів, наприклад, застосовуючи способи фосфатно-кальцієвого осадження, способи з використанням DEAE-декстрану (діаміноетиламіноетилового декстрану), способи, які застосовують катіонну ліпосому DOTAP (Boehringer-Mannheim), електропорацію та ліпофекцію.

Відомі клітини грибів включають дріжджі, такі як рід *Saccharomyces*, наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*, та міцеліальні гриби, такі як рід *Aspergillus*, наприклад, *Aspergillus niger*.

Коли застосовують прокаріотні клітини, доступними є виробничі системи, що застосовують бактеріальні клітини. Такі бактеріальні клітини включають *E. coli*, наприклад, JM109, DH5α та HB101. Можна також застосовувати *Bacillus subtilis*.

Ці клітини трансформуються полінуклеотидом, що представляє інтерес, та отримані трансформанти культивуються *in vitro* для отримання антитіл. Трансформанти можна культивувати, застосовуючи відомі способи. Культуральні середовища для тваринних клітин включають, наприклад, DMEM, MEM, RPMI 1640 та IMDM. Їх можна застосовувати з або без додавання сироватки, такої як фетальна теляча сироватка (FCS). Переважний показник pH такого культурального середовища становить приблизно 6 та 8. Зазвичай, такі клітини культивуються при приблизно 30-40 °C протягом приблизно 15-200 годин, та культуральне середовище за необхідністю змінюють, аерують або перемішують.

Антитіла цього винаходу, отримані, як описано вище, можна виділити з клітин-хазяїнів або ззовні клітин (середовища тощо) та очистити як по суті чисте гомогенне антитіло. Антитіла можна відокремити та очистити, застосовуючи без обмеження традиційні способи виділення та очищення для очищення антитіл. Наприклад, антитіла можна відокремити та очистити за допомогою відповідної селективної та поєднувальної колонкової хроматографії, фільтрації, ультрафільтрації, знесолювання, преципітації з розчинника, екстракції розчинника, дистиляції, імунопреципітації, електрофорезу на поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію, ізоелектрофокусування, діалізу, рекристалізації тощо.

Хроматографія включає, наприклад, афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрацію, хроматографію зі зворотною фазою та адсорбційну хроматографію (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Ці способи хроматографії можна виконати із застосуванням рідинної хроматографії, наприклад, рідинної хроматографії високого розділення (HPLC) та рідинної хроматографії швидкого розділення (FPLC). Колонки, що застосовуються для афінної хроматографії, включають колонки білка A та колонки білка G. Такі колонки білка A включають, наприклад, Hyper D, POROS та Sepharose FF (Pharmacia). Цей винахід також включає антитіла з високим ступенем очищення із застосуванням таких способів очищення.

Крім того, антиген-зв'язувальну ділянку моноклонального антитіла можна перенести до

інших імуноглобулінів. Антиген-зв'язувальні ділянки в імуноглобулінах складаються з гіперваріабельних ділянок (CDR) та каркасних ділянок. Антиген-зв'язувальна специфічність кожного імуноглобуліну визначається його CDR, а каркас підтримує структуру антиген-зв'язувальної ділянки. Амінокислотні послідовності CDR є надзвичайно різноманітними, тоді як амінокислотні послідовності каркасної ділянки є надзвичайно консервативними. Антиген-зв'язувальну специфічність можна також перенести шляхом вставки амінокислотної послідовності CDR у каркасну ділянку іншої молекули імуноглобуліну. Із застосуванням вищеописаних способів було розроблено способи перенесення антиген-зв'язувальної специфічності імуноглобулінів не людей до імуноглобулінів людей.

Будь-яке моноклональне антитіло, отримане, як описано вище, можна застосовувати у цьому винаході. Більш детально, у цьому винаході можна застосовувати моноклональні антитіла, які включають імуноглобуліни, що включають антиген-зв'язувальні ділянки, кодовані полінуклеотидами, що походять від кДНК, які кодують антиген-зв'язувальні ділянки таких моноклональних антитіл.

Гібридами, що продукують моноклональні антитіла, які можна застосовувати у цьому винаході, включають, наприклад, гібридами #4LD, #3LD та #9LD. Гібридому #4LD було депоновано за номером депонування FERM AP-21303 6 червня 2007 року у Міжнародному патентному депозитарії організмів Національного інституту розвинутої промислової науки та техніки, та наступний номер депонування FERM BP-10964 було надано як міжнародний депозит згідно з Будапештської угодою. Депонування характеризується наступним описом:

(а) Назва та адреса установи депозитарію

Назва: Міжнародний патентний депозитарій організмів Національного інституту розвинутої промислової науки та техніки.

Адреса: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Японія (поштовий індекс: 305-8566);

(b) Дата депонування: 6 червня 2007 року;

(c) Номер депонування: FERM BP-10964 (гібридома #4LD).

Моноклональні антитіла для застосування у цьому винаході можна збирати з культур гібридом, що продукують ці моноклональні антитіла. Гібридами можна культивувати *in vitro* або *in vivo*. Гібридами можна культивувати *in vitro*, застосовуючи відоме культуральне середовище, таке як RPMI1640. Імуноглобуліни, які виділяються з таких гібридом, накопичуються у культуральних надосадових рідинах. Отже, моноклональні антитіла цього винаходу можна отримати шляхом збирання таких культуральних надосадових рідин, а потім очищення, якщо необхідно. Імуноглобуліни можна очистити більш легко, коли застосовуються вільні від сироватки середовища. Проте, до середовищ можна додати приблизно 10 % фетальної телячої сироватки для швидкого росту гібридом та підвищення виробництва антитіл.

Гібридами можна також культивувати *in vivo*. Більш детально, шляхом інокуляції гібридом у черевну порожнину "голих" мишей гібридами можна культивувати у черевних порожнинах. Моноклональні антитіла накопичуються в асцитах. Отже, бажані моноклональні антитіла можна отримати шляхом узяття асцитів, потім очищення, якщо необхідно. Отримані моноклональні антитіла можна модифікувати або обробляти відповідно до певної мети.

Антитіла можуть бути химерними або моноклональними.

Моноклональні антитіла цього винаходу, що специфічно розпізнають BST2D, включають моноклональні антитіла, які розпізнають білки, що включають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, але не білки, що включають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21. Такі антитіла можна отримати, наприклад, шляхом вибору антитіл, які зв'язуються за певними умовами з поліпептидом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, але зв'язування яких з поліпептидом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21, не можна виявити за такими ж самими умовами. Більш детально, бажані антитіла можна вибирати, наприклад, шляхом трансформування клітин вектором експресії, який є носієм ДНК, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 21, та шляхом порівняння клітин стосовно властивостей зв'язування з антитілом. Відомі способи, такі як FACS, можна застосовувати для порівняння властивостей зв'язування антитіла з трансформованими клітинами.

Коли антитіло, яке специфічно розпізнає BST2D, вводиться хазяїну, який є гетерологічним до виду, з якого походить антитіло, тоді це антитіло переважно перетворюється у форму, яка ледь розпізнається хазяїном як сторонній матеріал. Наприклад, штучно модифіковані рекомбінантні антитіла, такі як химерні та гуманізовані антитіла, можна застосовувати для зниження гетерологічної антигенності проти людини. Ці модифіковані антитіла можна отримати, застосовуючи відомі способи. Химерне антитіло - це антитіло, що включає варіабельні ділянки

важкого та легкого ланцюгів антитіла від ссавця, який не є людиною, такого як миша, та константні ділянки важкого та легкого ланцюгів антитіла людини. Химерне антитіло можна отримати шляхом зшивання ДНК, що кодує варіабельні ділянки антитіла миші, з ДНК, що кодує константні ділянки антитіла людини, вставки цього у вектор експресії, а потім введення вектора у хазяїна для експресії.

Гуманізовані антитіла також називаються як "антитіла людини зі зміненою формою". Це антитіла, у яких гіперваріабельна ділянка (CDR) антитіла, що походить від ссавця, який не є людиною, наприклад, миші, переноситься до CDR антитіла людини, та звичайні способи генної рекомбінації є відомими. Коли вони перетворюються у молекули, описані нижче, тоді стає більш складним розпізнати імуноглобулін як сторонній матеріал. Відомими є способи обробки молекул імуноглобуліну, які описано нижче:

- фрагменти, що включають антиген-зв'язувальну ділянку, яка не має константної ділянки (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press Limited. 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996);

- химерні антитіла, що складаються з антиген-зв'язувальної ділянки моноклонального антитіла та константної ділянки імуноглобуліну хазяїна (Experimental Manual for Gene Expression, Kodansha 1994 (eds., I. Ishida and T. Ando));

- CDR-заміщені антитіла, у яких гіперваріабельну ділянку (CDR) імуноглобуліну хазяїна заміщено CDR моноклонального антитіла (Experimental Manual for Gene Expression, Kodansha 1994 (eds., I. Ishida and T. Ando)).

Альтернативно, відомий також спосіб отримання антитіл людини, які не мають гетерогенності проти людини. Наприклад, антитіла людини можна отримати від імунних тварин, що не є людьми, яким введено гени антитіла людини. Більш детально, трансгенних мишей, яким введено гени антитіла людини, застосовують на практиці як імунних тварин для виробництва антитіл людини (Ishida et al., Cloning and Stem Cells, 4: 85-95, 2002). Антитіла людини, що розпізнають BST2, можна отримати, застосовуючи таких тварин з BST2 людини, як антиген. Антитіла людини вводяться переважно людям.

Крім того, існує відомий спосіб отримання антитіл людини шляхом пенінгу із застосуванням бібліотек антитіл людини. Більш детально, гени для варіабельних ділянок імуноглобулінів людини можна отримати згідно зі способом фагової демонстрації (McCafferty J. et al., Nature 348: 552-554, 1990; Kretzschmar T. et al., Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec; 13(6): 598-602). Спосіб фагової демонстрації включає інтегрування генів, що кодують варіабельні ділянки імуноглобулінів людини, у фагові гени. Бібліотеки фагів можна отримати, застосовуючи різні гени імуноглобулінів як джерело. Такі варіабельні ділянки експресуються як білки, злиті з білками, що складають фаги. Варіабельні ділянки, що експресуються фагами на фагових поверхнях, зберігають антиген-зв'язувальну активність. Отже, фаги, що експресують варіабельні ділянки з бажаною зв'язувальною активністю можна піддавати скринінгу з фагових бібліотек, вибираючи при цьому фаги, які зв'язуються з антигенами, клітинами, що експресують антигени, або тощо. Крім того, фагові частинки, вибрані таким способом, несуть гени, які кодують варіабельні ділянки з бажаною зв'язувальною активністю. Більш детально, гени, що кодують варіабельні ділянки з бажаною зв'язувальною активністю, можна отримати за способом демонстрації фагів, застосовуючи зв'язувальну активність варіабельної ділянки як індикатор.

Антитіла, що застосовуються у цьому винаході переважно включають антитіла, які мають цитотоксичну активність.

У цьому винаході цитотоксична активність включає, наприклад, опосередковану антитілами клітинну цитотоксичність (ADCC) та комплементзалежну цитотоксичність (CDC). У цьому описі винаходу CDC означає цитотоксичну активність системи комплементу. ADCC означає активність спричиняти пошкодження клітинам-мішеням, коли специфічне антитіло зв'язується з антигеном на поверхні клітини-мішені, а клітини, що є носієм рецептора Fcγ (імунні клітини та інші), зв'язуються з Fc за допомогою рецептора Fcγ.

Чи має антитіло ADCC або CDC проти BST2, можна оцінити за допомогою відомих способів (дивись, наприклад, Current protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc. (1993)).

Більш детально, по-перше, отримують ефекторні клітини, розчини комплементу та клітини-мішені.

(1) Отримання ефекторних клітин (мононуклеарів периферійної крові людини)

Периферійну кров отримують від здорових донорів-людей. Мононуклеари периферійної крові виділяють з крові за способом Ficoll та застосовують як ефекторні клітини.

(2) Отримання розчину комплементу

Розчини комплементу можна отримати при кінцевій концентрації комплементу, яка

становить 6 %, шляхом розведення комплементу кролячати (Baby Rabbit Complement (CEDARLANE)) середовищем для CDC.

(3) Отримання клітин-мішеней

Клітини, що експресують білок BST2, такі як клітини CHO або клітини RPMI8226, які походять з мієломи людини та які експресують білок BST2D або BST2H, можна застосовувати як клітини-мішені.

Клітини, що експресують білок BST2, включають клітини, трансформовані геном, що кодує білок BST2, та різні пухлинні клітини. ADCC та CDC можна визначити за допомогою способів, описаних нижче.

Аналіз CDC здійснюється шляхом додавання клітин-мішеней та антитіла проти BST2 при концентрації кожного 50 мкл/комірку до планшета з 96 комітками з круглим дном. Потім додають 50 мкл розчину комплементу та планшет інкубують в інкубаторі з газоподібним діоксидом вуглецю при 37 °C протягом 2 годин. Кінцеву концентрацію антитіла доводять до 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл або 10 мкг/мл. Культуральні надосадові рідини збирають після культивування. "Кількість (експериментальний зразок) витоку LDH з клітин-мішеней внаслідок активності комплементу" визначається шляхом вимірювання рівня LDH в кожній культуральній надосадовій рідині із застосуванням CytoTox96™ Assay (PROMEGA).

Аналіз CDC здійснюється із застосуванням наступних контрольних:

(1) експериментальне вивільнення LDH (цитотоксичність комплементу проти клітин-мішеней);

(2) спонтанне вивільнення LDH з клітин-мішеней;

(3) максимальне вивільнення LDH з клітин-мішеней;

(4) контроль нормалізації для рідкого об'єму після додавання розчину для лізису та

(5) фоновий рівень тільки у культуральному середовищі (пустий).

Середня абсорбція для пустого (5) віднімається від кожного середнього значення для абсорбції, визначеної для (1), (2) та (3). Потім CDC підраховують згідно з наступною формулою:

$$\text{CDC (\%)} = \frac{[(\text{експериментальне вивільнення}) - (\text{спонтанне вивільнення з мішені})]}{[(\text{максимальне вивільнення з мішені}) - (\text{контроль нормалізації для рідкого об'єму мішені}) - (\text{спонтанне вивільнення з мішені})]} \times 100$$

Аналіз ADCC здійснюється шляхом додавання 50 мкл/комірку клітин-мішеней (клітин BST2(D)-CHO, клітинної лінії RPMI8226, що походить від мієломи людини) (4×10^5 /мл) до планшета з 96 комітками з круглим дном. Розчин антитіла проти BST2 додається при кінцевій концентрації антитіла 10 мкг/мл. Клітини інкубують при 4 °C протягом 30 хвилин. Ефекторні клітини (PBMNC) додаються у кількості 12,5, 25, 50 або 100 разів від кількості клітин-мішеней. Змішані клітини інкубують при 37 °C протягом 4 годин. Рівень LDH у клітинній надосадовій рідині вимірюється для визначення кількості (експериментальний зразок) витоку LDH з клітин-мішеней як результату цитотоксичності. Аналіз ADCC здійснюється із застосуванням контрольних зразків, подібних до зразків в аналізі CDC.

Різні пухлини, що експресують BST2D, можна лікувати або попереджати шляхом введення BST2D-специфічних антитіл цього винаходу. Конкретно, цим винаходом пропонуються способи лікування пухлин, що експресують BST2D людини, при цьому способи включають етап введення пацієнтам антитіл або їх фрагментів, які включають антиген-зв'язувальний домен, які зв'язуються з BST2D, але є по суті нездатними зв'язуватися з BST2H. Кров'яні пухлини, які можна лікувати згідно з цим винаходом, включають пухлини, перелічені нижче. Кров'яні пухлини включають гематопоетичні пухлини.

Лейкоз.

Мієлодиспластичний синдром (MDS).

Злоякісна лімфома.

Хронічний мієлоїдний лейкоз.

Дискразія плазматичних клітин.

Мієлопроліферативний розлад.

Серед вищезгаданих кров'яних пухлин дискразія плазматичних клітин включає мієлому, множинну мієлому та макроглобулінемію. Мієлопроліферативний розлад включає первинну поліцитемію, суттєву тромбоцитемію та ідіопатичну мієлоїдну метаплазію. Серед цих кров'яних пухлин мієлома, конкретніше, множинна мієлома є переважною терапевтичною мішенню. Очікується, що антитіла цього винаходу будуть особливо корисними, якщо їх вводити у живий організм, тому що вони можуть специфічно зв'язуватися з клітинами, які служать як терапевтичні або діагностичні мішені у тілі, без неспецифічного зв'язування з тканинами, які не є цільовими для терапії або діагностики.

Автори цього винаходу визначили, що антитіла цього винаходу мають CDC та ADCC. На

підставі цього відкриття цим винаходом пропонуються засоби для лікування пухлин, які включають антитіла цього винаходу як активний інгредієнт. Крім того, при застосуванні з терапевтичними або профілактичними цілями антитіла цього винаходу можна застосовувати після модифікації, якщо вона є необхідною. Антитіла цього винаходу, які специфічно розпізнають зовнішньоклітинний домен BST2D людини, демонструють цитотоксичність проти клітин, що експресують BST2D. Цитотоксичну дію на клітини, що експресують BST2D, можна далі підсилювати шляхом модифікування антитіл цитотоксичними засобами. Такі цитотоксичні засоби включають наступні речовини.

Токсини: ендотоксин *Pseudomonadaceae* (PE), токсин дифтерії, ріцин.

Радіоізотопи: Tc^{99m} , Sr^{89} , I^{131} , Y^{90} .

Протиракові засоби: каліхеаміцин, мітоміцин, паклітаксел.

Токсини, що включають білки, можна зв'язати з антитілами, їх фрагментами або їм подібним, застосовуючи реагенти з подвійними функціями. Альтернативно, злиті білки можна отримати шляхом зшивання генів, що кодують антитіло, з генами, що кодують токсин. Також відомими є способи для зв'язування антитіл з радіоізотопами. Наприклад, відомими є способи мічення антитіл радіоізотопами із застосуванням хелатоутворюючих агентів. Крім того, протиракові засоби можна зв'язувати з антитілами, застосовуючи цукрові ланцюги або реагенти з подвійними функціями.

Цим винаходом пропонуються терапевтичні засоби проти пухлин, які включають антитіло цього винаходу як активний інгредієнт. Антитіла цього винаходу мають CDC та ADCC, та на підставі цього очікують, що вони будуть ефективними особливо для лікування та профілактики пухлин, таких як рак (особливо кров'яні пухлини).

Коли антитіло цього винаходу застосовується як терапевтичний засіб, рідкі препарати, що включають антитіло цього винаходу, можна вводити, наприклад, самі по собі внутрішньо або підшкірно або у комбінації з іншими терапевтичними засобами. Такі терапевтичні засоби, що застосовуються у комбінації, включають, наприклад, відомі терапевтичні засоби для лікування множинної мієломи. Терапевтичні засоби, що застосовуються для лікування мієломи, включають ті засоби, які перелічені нижче.

Бортезоміб Талідомід Леналідомід

Мелфалан Дексаметазон Вінкрисин

Доксорубіцин Інтерферон- α Ритуксимаб

Крім того, терапевтичні засоби для підсилення дії антитіл можна також застосовувати на додаток до терапевтичних засобів для лікування мієломи. Наприклад, засіб, що зміцнює імунітет, можна вводити як засіб для підвищення ефекторної активності разом з антитілами цього винаходу. Більш детально, можна очікувати, що ефекторну активність антитіла можна підвищити шляхом введення антитіла цього винаходу у комбінації з інтерфероном- γ , інтерлейкіном-2, інтерлейкіном-12 та їм подібним. Альтернативно, такий ефект зміцнення імунітету можна також очікувати від застосування агоністу Toll-подібного рецептора, включаючи CpG-олігонуклеотиди.

Антитіло або його фрагмент, що специфічно розпізнає BST2D, або антитіло, яке включає принаймні його антиген-зв'язувальний домен, можна вводити у формі білка або поліпептиду, що кодує його, як терапевтичний засіб цього винаходу проти пухлин. Коли вводиться такий поліпептид, переважно застосовувати вектор, у якому поліпептид, що кодує білок, який представляє інтерес, запроваджений під контролем відповідного промотора, так щоб експресувати білок, що представляє інтерес. Енхансери та термінатори можна також влаштувати у вектор. Існують відомі вектори, які несуть гени для важких та легких ланцюгів, які складають імуноглобулін та які є здатними експресувати молекулу імуноглобуліну.

Вектори, які можуть експресувати імуноглобуліни, можна вводити шляхом введення їх у клітини. Коли їх вводять у живі організми, вектори, які можуть інфікувати клітини під час введення у живі організми, можна вводити як такі. Альтернативно, такі вектори можна ввести (ex vivo) у лімфоцити, виділені з живих організмів, а потім повернути ці лімфоцити до організму.

Крім того, коли вектор експресії імуноглобуліну вводять у живий організм, плазмід, які є носіями важкого ланцюга та легкого ланцюга, поокремо, можна вводити у дозі від 0,1 до 10 мг/кг маси для кожної плазмід, наприклад, від 1 до 5 мг/кг маси для ко-трансфекції. Такі вектори можна також вводити у клітини in vitro у дозі від 1 до 5 мкг/10⁶ клітин.

Терапевтичні засоби цього винаходу можна вводити як фармацевтичні препарати, та їх можна вводити системно або місцево шляхом перорального або парентерального введення. Можна вибрати, наприклад, внутрішньовенні ін'єкції, такі як інфузії за допомогою крапельниці, внутрішньом'язові ін'єкції, внутрішньочеревні ін'єкції, підшкірні ін'єкції, супозиторії, клізми, пероральні черевні таблетки або їм подібне. Відповідні способи введення можна вибрати

залежно від симптомів та віку пацієнта. Доза терапевтичного засобу, який слід вводити у живий організм, у термінах моноклонального антитіла зазвичай становить від 0,5 мг до 100 мг імуноглобуліну на кілограм маси, наприклад, від 1 мг до 50 мг імуноглобуліну/кг маси, а переважно від 2 мг до 10 мг імуноглобуліну /кг маси. Інтервали між введенням антитіла у живий організм можна відповідним чином відрегулювати, так щоб ефективна *in vivo* концентрація імуноглобуліну підтримувалася під час лікування. Більш детально, наприклад, введення можна виконувати з інтервалами від 1 до 2 тижнів.

Спосіб введення є довільним. Фахівці у галузі можуть відповідним чином вибрати ефективні способи введення для лікування. Більш детально, введення може бути пероральним або парентеральним. Наприклад, антитіла можна вводити системно або місцево шляхом внутрішньовенних, внутрішньом'язових, внутрішньочеревних або підшкірних ін'єкцій або їм подібним. У цьому винаході препарати, придатні для парентерального введення, включають ін'єкції, супозиторії та спреї. Альтернативно, при додаванні до клітин імуноглобуліни зазвичай додаються до культуральних середовищ при концентрації, що становить 1 мкг/мл, переважно 10 мкг/мл або вище, більш переважно 50 мкг/мл або вище та іще більш переважно 0,5 мг/мл або вище.

Агенти для лікування пухлин цього винаходу можна вводити у живий організм за будь-яким способом. Моноклональні антитіла зазвичай виробляють у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та використовують як терапевтичні засоби. Терапевтичні засоби цього винаходу можна об'єднувати з добавками, такими як загусники, стабілізатори, консерванти та солюбілізатори, якщо необхідно. Такі носії або добавки включають лактозу, лимонну кислоту, стеаринову кислоту, магнію стеарат, цукрозу, крохмаль, тальк, желатин, агар, рослинні олії та етиленгліколь.

Термін "фармацевтично прийнятний" означає бути ухваленим контролюючими органами уряду у кожній країні або бути описаним у термінах застосування його для тварин, ссавців та особливо для людей у фармакопеї у кожній країні або загально відомій фармакопеї. Такі терапевтичні засоби цього винаходу можуть також мати форму порошків або таблеток, висушених при низьких температурах у єдиній або багаторазовій дозі. Такі висушені при низьких температурах порошки або таблетки можна об'єднати зі стерильною водою, фізіологічним сольовим розчином або буферами для ін'єкцій, які застосовуються для розчинення композиції до бажаної концентрації перед введенням.

Антитіла, які специфічно розпізнають BST2D людини та які запропоновані цим винаходом, можна застосовувати для виявлення клітин, що експресують BST2D людини. Хвороби, які спричиняються клітинами, які експресують BST2D, можна діагностувати, наприклад, шляхом виявлення клітин, що експресують BST2D людини у тілі або у тканині, узятій з організму людини. Конкретно, цей винахід стосується діагностичних засобів для виявлення тканин, що експресують антиген BST2D людини, які включають антитіло цього винаходу, яке специфічно розпізнає BST2D людини, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен. Альтернативно, цей винахід стосується застосування антитіл цього винаходу, які специфічно розпізнають BST2D людини, або їх фрагментів, які включають антиген-зв'язувальний домен, для виробництва діагностичних засобів для виявлення тканин, що експресують антиген BST2D людини. Цей винахід далі відноситься до застосування антитіл цього винаходу, які специфічно розпізнають BST2D людини, або їх фрагментів, які включають антиген-зв'язувальний домен, для діагностики для виявлення тканин, що експресують антиген BST2D людини.

У цьому винаході тканини, що експресують антиген BST2D людини, включають, наприклад, пухлини, що експресують антиген BST2D людини. Було продемонстровано, що пухлини, які походять від клітин кісткового мозку, більш конкретно мієлома, експресують антиген BST2D людини з високими рівнями. Тип мієломи, який є особливо переважним у якості мішені діагнозу у цьому винаході, - це множинна мієлома.

Антитіла цього винаходу, які специфічно розпізнають BST2D людини, або їх фрагменти, які включають антиген-зв'язувальний домен, можна застосовувати для діагностики *in vivo* або *in vitro*. Наприклад, клітини або тканини, що експресують антиген BST2D людини, такі як мієлома, можна ідентифікувати *in vitro* зі зразків, узятих у пацієнтів. Біологічні тканини, що застосовуються при такій діагностиці, включають тканини кісткового мозку. Альтернативно, локалізацію клітин або тканин, що експресують антиген BST2D людини у живому організмі, можна ідентифікувати шляхом введення пацієнтові антитіла, яке специфічно розпізнає BST2D людини, та моніторингу накопичення антитіла.

Відомими є способи виявлення *in vitro* зв'язування антитіл з клітинами або тканинами. Наприклад, коли антитіла заздалегідь мітять флуоресцентним барвником або ферментом, тоді їх зв'язування з фіксованими зразками можна контролювати, застосовуючи мітку як індикатор.

Альтернативно, антитіла можна мітити непрямим способом, застосовуючи систему авідин-біотину. Можна застосовувати способи *in vivo* для моніторингу присутності антитіл у живому організмі, застосовуючи мічені радіонуклеїдами антитіла. Наприклад, способи діагностики за допомогою зображення із застосуванням антитіл, які розпізнають пухлини та які є міченими радіонуклеїдами, такими як технецій ^{99m}Tc , було запроваджено для практичного застосування для діагностики тканин пухлини в організмі. Антитіла та їх фрагменти, які містять антиген-зв'язувальний домен, можна безпосередньо мітити ^{99m}Tc шляхом відновлення. Радіонуклеїди, що вводяться в організм, можна спостерігати як зображення, отримане внаслідок застосування сцинтиляційних камер або комп'ютерних гамма-томографів (SPECT). Локалізацію пухлинних тканин, що експресують BST2D людини, можна визначити завдяки застосуванню таких способів до цього винаходу. Більш детально, такі способи можна застосовувати для діагностики первинного та метастатичного осередків.

Наприклад, тканини, що експресують BST2D у живому організмі, можна виявити за допомогою сцинтиграфії. У цьому способі антитіло цього винаходу, яке специфічно розпізнає BST2D людини, або його фрагмент, який включає антиген-зв'язувальний домен, мітиться ^{99m}Tc або їм подібним. Мічене антитіло або фрагмент антитіла вводяться пацієнтові, та випромінювання ^{99m}Tc контролюється ззовні організму. Такі мічені антитіла та фрагменти можна також застосовувати для вибору відповідних пацієнтів для введення антитіла цього винаходу, яке специфічно розпізнає BST2D людини, або його фрагмента, який включає антиген-зв'язувальний домен, за допомогою виявлення експресії антигену BST2D людини у пухлинах.

Моноклональні антитіла цього винаходу специфічно розпізнають клітини та тканини, що експресують BST2D людини. Отже, клітини та тканини, що експресують BST2D людини, такі як мієлома, можна специфічно ідентифікувати *in vitro*. Подібно до цього, клітини та тканини, що експресують BST2D людини, можна виявляти селективно *in vivo*. BST2 також включає варіанти, такі як BST2H, які продемонстрували, що вони експресуються у клітинах, відмінних від мієломи. Отже, фонові поміхи та неспецифічні сигнали особливо можна виключити *in vivo*, застосовуючи BST2D-специфічні антитіла.

Усі документи з попереднього рівня винаходу, які процитовано у цьому описі винаходу, включено до цього опису винаходу шляхом посилання.

Далі у цьому описі винаходу цей винахід буде специфічно описано з посиланням на розділ "Приклади", проти їх не слід вважати обмежувальними для цього винаходу.

Приклади

Приклад 1. Отримання гібридом, що продукують мишаче антитіло проти людського BST2

А. Отримання імуногену

Клітини, які слід застосовувати як імуноген, отримали шляхом введення гена BST2D людини у клітини T293 за допомогою наступного способу. 4 мкг вектора експресії pCDNA3.1-hBST2D, який несе ген як вставку, додали до 100-мм чашки, покритої колагеном (Collagen Coated Dish (IWAKI)), та змішали з 3 мл опти-MEM (GIBCO) (MEM - це мінімальне підтримуюче середовище), яке покриває усю поверхню дна чашки. Потім, окремо від розчину вектора експресії, 58 мкл LipofectamineTM2000 (Invitrogen) розвели 3 мл опти-MEM, внаслідок чого отримали розчин ліпоектаміну. Отриманий розчин залишили відстоюватися при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Потім розчин ліпоектаміну обережно додали до чашки, що містила розчин вектора експресії. Об'єднаний розчин перемішали та залишили відстоюватися при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. 10 мл клітин 293T, розведених при 1×10^6 клітин/мл DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла) (SIGMA), що містило 10 % FBS (фетальної телячої сироватки), обережно додали до чашки. Після того, як клітини інкубували в інкубаторі CO₂ при 37 °C протягом 48 годин, їх зібрали за допомогою піпетки. Клітини застосовували як трансфектант для імунізації.

В. Отримання гібридоми

(B-1) Імунізація

За день до початку імунізації клітинами 293T, до яких було введено ген BST2D людини, по 200 мкл кожного з PBS (фосфатно-сольовий буферний розчин) та ад'юванту (повний ад'ювант (FREUND); Mitsubishi Kagaku Iatron, RM606-1) об'єднали разом та 50-мкл аліквотні проби отриманої емульсії ввели шляхом ін'єкції у ступні кожної з чотирьох самок мишей Balb/c (віком 4 тижні) для імунізації. Наступного дня 2×10^7 клітин суспендували у 400 мкл PBS та 50-мкл аліквотну пробу суспензії ввели шляхом ін'єкції кожній миші для імунізації. Другу та третю імунізацію здійснювали з триденними інтервалами та через три дні після третьої імунізації здійснювали злиття клітин за наступною процедурою.

(B-2) Злиття клітин

Клітини узяли з лімфатичних вузлів обох лап кожної імунізованої миші. Клітини лінії мієломи

мишей P3-X63-Ag8-U1, культивовані у RPMI1640 (SIGMA), що містило 10 % FBS, поєднали з клітинами лімфатичних вузлів мишей у співвідношенні від 2:1 до 10:1. Об'єднані клітини зібрали шляхом центрифугування. PEG4000 (MERCK), розведений рівним об'ємом RPMI1640, додали до отриманої клітинної фракції, щоб здійснити злиття клітин. Після промивання клітини суспендували у 160 мл 15 % FBS-HAT, що містило добавки, та перенесли до 16 планшетів з 96 комітками по 200 мкл/комітку. Середовище змінили через три дні. Первинний скринінг здійснювали через 1-2 тижні після того, як підтвердилося утворення колоній.

С. Первинний скринінг гібридом за допомогою способу клітинного ELISA

Первинний скринінг гібридом, які продукують антитіло та які представляють інтерес, здійснювали, застосовуючи спосіб клітинного ELISA за наступною процедурою. 1×10^7 клітин, отриманих, як описано в розділі А Прикладу 1, суспендували у 10 мл 0,5 % BSA/2 mM EDTA/PBS та аліквоти розподілили у планшети для клітинного ELISA (NUNC 249570 96V NW PS) по 100 мкл/комітку. Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин. Після того, як видалили надосадові рідини, надосадові рідини з культурами гібридом додали по 50 мкл/комітку. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Після двох раундів промивання (0,5 % BSA/2mM EDTA/PBS) до комірок додали 50 мкл розведеного у 10000 разів міченого пероксидазою антитіла козла проти мишачого IgG (MBL; Code330). Планшети інкубували протягом 30 хвилин. Після трьох раундів промивання додали хромогенний розчин та вимірювали OD (оптичну густину) при 450 нм - 620 нм для селекції позитивних комірок.

D. Оцінка зв'язувальної активності антитіла шляхом проточного цитометричного аналізу (FCM)

Надосадові рідини з культурою гібридом проаналізували за допомогою проточної цитометрії (FCM). Клітини, отримані як описано у розділі А Прикладу 1, суспендували у 0,5 % BSA/2 mM EDTA/PBS та збирали у пробірках центрифугування по 1×10^5 клітин/комітку. Додали 40 мкл кожної надосадової рідини культури гібридами та пробірки інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Потім 1-мл аліквоту 0,5 % BSA/2 mM EDTA/PBS додали до кожної пробірки, пробірки центрифугували протягом 3 хвилин зі швидкістю 1200 обертів за хвилину при 4 °C та відкинули надосадові рідини; цей процес промивання повторили двічі. Після промивання до кожної пробірки додали 40-мкл аліквоту розведеного у 100 разів FITC-міченого антитіла козла проти мишачого IgG (Beckman coulter; IM0819). Пробірки інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Після двох раундів промивання надосадові рідини з культурою гібридом проаналізували за допомогою цитометра FC500 (Beckman coulter), щоб оцінити, чи може антитіло в надосадових рідинах специфічно розпізнавати BST2D людини. За допомогою FCM-аналізу вибрали гібридами, що продукують антитіла, які специфічно зв'язуються з клітинами 293T, які експресують BST2D людини, але є нездатними зв'язуватися з клітинами 293T, які не експресують BST2D людини. Вибрані гібридами клонували за допомогою способу обмежувального розведення. Отримані гібридами, що продукують мишаче антитіло проти BST2 людини, назвали #3LD, #4LD, #7LD, #9LD та #19LD.

Приклад 2. Отримання мишачих моноклональних антитіл проти BST2 людини та оцінка їх специфічності

A. Гібридомна культура

Кожну з гібридом #3LD, #4LD, #7LD, #9LD та #19LD, які отримано у Прикладі 1, які продукують мишаче антитіло проти BST2 людини, культивували у RPMI, до якого додано 5 % FBS. Склад культурального середовища наведено нижче. Тривалість та температура культивування становили 96 годин та 37 °C, відповідно.

RPMI, до якого додали 5 % FBS:

RPMI1640 (Sigma; номер за каталогом R8758)

5 % FBS

0,01 M HEPES

1 mM пірувату натрію

2 mM L-Глутаміну

100 одиниць/мл пеніциліну

100 мкг/мл стрептомицину

55 мкМ 2-меркаптоетанолу

pH 7,2-7,4.

Після 96 годин культивування надосадову рідину культури кожної гібридами зібрали та клітинний дебрис видалили шляхом центрифугування. Отриману надосадову рідину застосовували як сирий розчин антитіла.

B. Очищення антитіла

Кожен з сирих розчинів антитіла, отриманих, як описано в розділі А, очистили, застосовуючи колонку для проведення афінної хроматографії з білком А (rProtein A Sepharose FF; Amersham Pharmacia, номер за каталогом № 17-1279-01). Умови очищення описано нижче. Афінне очищення виконували згідно з інструкцією, доданою до колонки, застосовуючи при цьому буфер PBS(-) як буфер адсорбції та буфер 0,1 М цитрату натрію (pH 3) як буфер елюції. Склад PBS(-) наведено нижче. pH елюйованих фракцій довели до приблизно 7,2 шляхом додавання 1 М Tris-HCl (pH 8,0). Буфер кожного отриманого розчину антитіла замінили PBS(-), застосовуючи мембрану для діалізу (відрізання 10000; PIERCE). Отримали очищені мишачі моноклональні антитіла проти BST2 людини #3LD, #4LD, #7LD, #9LD та #19LD (далі скорочені як "мишаче антитіло #3LD", "мишаче антитіло #4LD" тощо). Концентрації очищених антитіл визначили шляхом вимірювання абсорбції при 280 нм та розрахунку на основі перетворення 1,38 OD (оптичної густини) в 1 мг/мл.

Буфер PBS(-):

0,2 г/л дигідрофосфату калію

0,2 г/л хлориду калію

8 г/л хлориду натрію

1,15 г/л безводного гідрофосфату натрію.

С. Оцінка специфічності антитіла

(С-1) Отримання лінії клітин-мішеней (клітинної лінії BST2D-CHO)

За день до введення вектора клітини CHO-K1 помістили у 6-см чашки по 6×10^5 клітин/чашку. Вектор експресії, що є носієм гена BST2D людини, ввели у клітини, застосовуючи Effectene Transfection Reagent (QIAGEN). Клітини обробили 800 мкг/мл Zeocin (Invitrogen), щоб вибрати стійкі до зеоцину лінії, у які був уведений вектор.

Введений вектор експресії BST2D людини: pCDNA3.1-hBST2D; 2 мкг.

Потім отримали клітинну лінію, що експресує BST2D (клітинна лінія BST2D-CHO) з високим рівнем, застосовуючи клітинний сортер (BD FACSAria (Becton Dickinson)). Шляхом FCM-аналізу підтвердили, що вибрана клітинна лінія експресує BST2D з високим рівнем. FCM-аналіз здійснювали за процедурою, описаною у розділі D Прикладу 1, за винятком застосування BD FACSCaliber (BD) в FCM. Наступне антитіло застосовували у цьому аналізі.

Антитіло, що застосовували в FCM-аналізі: 488-кон'юговане щуряче антитіло проти BST2-5C11 людини (це антитіло проти BST2-5C11 людини описано у міжнародній публікації WO 2006/013923).

(С-2) Отримання лінії клітин-мішеней (лінія BST2H-CHO)

Клітинну лінію, що експресує BST2H (клітинна лінія BST2H-CHO) з високим рівнем, отримали за такою ж самою процедурою, яку описано у розділі (С-1), за винятком введення вектора експресії BST2H людини (pCDNA3.1-hBST2H). Наступне антитіло застосовували в FCM-аналізі.

Антитіло, що застосовували в FCM-аналізі: 488-кон'юговане щуряче антитіло проти BST2-3D3 людини (антитіло проти BST2-3D3 людини є антитілом, що продукується гібридомою, депонованою за номером доступу FERM BP-10339, та воно описано у міжнародній публікації WO 2006/013923).

(С-3) Оцінка специфічності зв'язування очищених мишачих моноклональних антитіл проти BST2 людини

П'ять типів очищених мишачих моноклональних антитіл проти BST2 людини, отриманих, як описано вище у розділі В, оцінювали стосовно їх специфічності зв'язування, застосовуючи клітинну лінію BST2D-CHO, отриману, як описано у розділі (С-1), та клітинну лінію BST2H-CHO, отриману, як описано у розділі (С-2). Оцінку здійснювали шляхом FCM-аналізу згідно з традиційним способом. Результат FCM-аналізу показав, що мишачі антитіла #3LD, #4LD та #9LD зв'язувалися з клітинами BST2D-CHO, але не з клітинами BST2H-CHO. Виявили, що мишачі антитіла #7LD та #19LD зв'язуються як з клітинами BST2D-CHO, так і з клітинами BST2H-CHO. Отже, у наступних експериментах з мишачими антитілами #3LD, #4LD та #9LD працювали як з антитілами, які зв'язуються тільки з типом D BST2 (далі позначається як "антитіло проти BST2(D+/H-) людини"), тоді як з мишачими антитілами #7LD та #19LD працювали як з антитілами, що зв'язуються як з типом D, так і з типом H BST2 (далі позначається як "антитіло проти BST2(D+/H+) людини"). Приклад результату, отриманого внаслідок FCM-аналізу мишачих антитіл #4LD та #19LD, наведено на Фіг. 2.

(С-4) оцінка реактивності мишачого антитіла проти HM1.24 людини

Антитіло проти HM1.24 (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.), яке є мишачим антитілом проти BST2 людини, оцінювали стосовно його специфічності зв'язування за допомогою FCM-аналізу, застосовуючи такий самий спосіб, як описано у розділі (С-3). Результат FCM-аналізу наведено

на Фіг. 2 разом з результатом (C-3). Також переконалися у тому, що мишаче антитіло проти HM1.24 людини - це антитіло, що зв'язується з обома клітинними лініями BST2D-CHO та BST2H-CHO.

Приклад 3. Аналізи CDC та ADCC антитіла проти BST2(D+/H-) людини

5 А. Антитіло

Застосовуючи мишаче антитіло #4LD, отримане, як описано у Прикладі 2, здійснювали аналіз CDC за способом, описаним нижче.

В. Аналіз CDC

(B-1) Лінії клітин-мішеней

10 Наступні клітини застосовували як лінії клітин-мішеней:

- клітинна лінія BST2D-CHO: отримали за такою ж самою процедурою, як описано у розділі (C-1) Прикладу 2;

- клітинна лінія BST2H-CHO: отримали за такою ж самою процедурою, як описано у розділі (C-2) Прикладу 2;

15 - клітинна лінія RPMI8226, що походить від мієломи людини.

(B-2) Реакція клітин-мішеней з антитілом проти BST2(D+/H-) людини

Клітини BST2D-CHO та BST2H-CHO, описані вище у розділі (B-1), зібрали, застосовуючи розчин 5 mM EDTA/PBS, а потім суспендували по 4×10^5 клітин/мл у середовищі для CDC. Склад середовища показано нижче. Клітини RPMI8226, що походять від мієломи людини, також суспендували по 4×10^5 клітин/мл у середовищі для CDC. Ці суспензії аліквотами розподілили у планшетах з 96 комірками з круглим дном по 50 мкл/комірку.

Середовище для CDC:

RPMI1640,

0,1 % BSA,

25 100 одиниць/мл пеніциліну,

100 мкг/мл стрептоміцину,

10 mM Hepes (pH 7,6),

2 mM L-Глутаміну.

Розчини антитіла проти BST2(D+/H-) (розчини мишачого антитіла #4LD) отримали з кінцевою концентрацією антитіла 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл або 10 мкг/мл, застосовуючи при цьому середовище для CDC. До клітин додали 50-мкл аліквоти розчинів. Після змішування до клітин додали 50 мкл середовища для CDC, яке містило комплемент, з кінцевою концентрацією комплементу 6 %. Склад середовища показано нижче. Отримані суміші інкубували при 37 °C протягом 2 годин. Зразки, що містили мишачий IgG2a, замість антитіла проти BST2(D+/H-), також приготували та застосовували як контрольні. Аналіз CDC із застосуванням антитіла проти HM1.24, антитіла проти BST(D+/H+) здійснювали одночасно з аналізом контрольних зразків для порівняння з мишачим антитілом #4LD.

Середовище для CDC, що містить комплемент:

1 мл комплементу кроляти (CEDARLANE, номер за каталогом CL3441);

40 Середовище для CDC (описано вище).

Потім планшети з 96 комірками з круглим дном, які містили суспензії, центрифугували (умови центрифугування: 250 G протягом 4 хвилин). Культуральні надосадові рідини обережно зібрали так, щоб не забруднити клітини. Рівні LDH у культуральних надосадових рідинах визначили, застосовуючи CytoTox96™ Assay (PROMEGA). Рівень LDH визначили як "кількість витоку LDH з клітин-мішеней внаслідок активності комплементу (Експериментальний зразок)".

45 Параметри, які описано нижче, також застосовували для визначення CDC:

- кількість LDH, що спонтанно вивільнилася з клітин-мішеней (спонтанне вивільнення LDH з клітин-мішеней): отримали шляхом культивування такого ж самого об'єму клітин-мішеней самих по собі, що і зразків.

50 - кількість максимального вивільнення LDH з клітин-мішеней (максимальне вивільнення LDH з клітин-мішеней): отримали шляхом культивування такого ж самого об'єму клітин-мішеней самих по собі, що і зразків. За 60 хвилин до збирання надосадових рідин додали розчин TritonX-100, що додається до набору, з кінцевою концентрацією 0,8 %.

55 - контроль нормалізації рідкого об'єму (контроль корекції об'єму): отримали внаслідок додавання такого ж самого об'єму TritonX-100, як і при одержанні "максимального вивільнення LDH з клітин-мішеней", до такого ж самого об'єму культурального середовища, що і зразок. "Контроль корекції об'єму" позначається як "контроль об'єму" у формулі розрахунку CDC (%), яку наведено нижче.

60 - контроль фоновому рівня у культуральному середовищі (фон культурального середовища): розчин такого ж самого об'єму, що і зразки, отримали шляхом додавання середовища CDC, що

містило комплемент, до культурального середовища такого ж самого об'єму, що і зразки.

Абсорбцію кожного з "максимального вивільнення з клітин-мішеней" та абсорбцію "спонтанного вивільнення з клітин-мішеней" нормалізували шляхом віднімання абсорбції середовища з однаковим зі зразком об'ємом. Абсорбцію "експериментального зразка" нормалізували шляхом віднімання абсорбції розчину з однаковим зі зразком об'ємом, отриманого внаслідок додавання до цього середовища середовища CDC, що містило комплемент.

CDC підраховували з кожного з визначених рівнів LDH згідно з наступною формулою.

Формула 1:

$$\text{CDC (\%)} = \frac{[(\text{експериментальний зразок}) - (\text{спонтанне вивільнення з мішені})] / [(\text{максимальне вивільнення з мішені}) - (\text{контроль об'єму}) - (\text{спонтанне вивільнення з мішені})]}{100}$$

Результати наведено на Фіг. 3. Мишаче антитіло #4LD (антитіло проти BST2(D+/H-) людини) майже не мало CDC проти клітин BST2(H)-CHO, але, навпаки, демонструвало сильну CDC проти клітин BST2(D)-CHO.

С. Аналіз ADCC

(C-1) Лінії клітин-мішеней та ефекторні клітини

Лінії клітин-мішеней, що застосовувалися, є наступними:

- клітинна лінія BST2D-CHO: отримали за такою ж самою процедурою, як описано у розділі (C-1) Прикладу 2;

- клітинна лінія RPMI8226, що походить від мієломи людини.

Ефекторні клітини, що застосовувалися, є наступними:

- мононуклеари периферійної крові людини: застосовувалися мононуклеари периферійної крові, виділені з периферійної крові людини за способом Ficoll.

(C-2) Реакція клітин-мішеней, антитіла проти BST2(D) людини та ефекторних клітин

Клітини BST2D-CHO та клітини RPMI8226, які походять від мієломи людини та які описано вище у розділі (B-1), зібрали, застосовуючи розчин 5 mM EDTA/PBS, та суспендували по 4×10^5 клітин/мл у RPMI, що містило 10 % FBS. Ці суспензії аліквотами розподілили у планшети з 96 комітками з круглим дном по 50 мкл/комірку.

Розчин антитіла проти BST2 отримали з кінцевою концентрацією антитіла 10 мкг/мл, застосовуючи RPMI, що містило 10 % FBS. До клітин додали 50 мкл розчину антитіла. Після змішування клітини інкубували при 4 °C протягом 30 хвилин. Потім ефекторні клітини об'єднали у кількості, що у 25, 50 або 100 разів перебільшувала кількість клітин-мішеней, та по 50 мкл кожної з клітинних сумішей додали до планшетів. Після змішування планшети центрифугували (умови центрифугування: 250 G протягом 4 хвилин), щоб клітини-мішені та ефекторні клітини наблизилися. Потім клітини інкубували при 37 °C протягом 4 годин. Антитіла проти BST2, що застосовувалися, були наступними: мишаче антитіло #4LD (антитіло проти BST2(D+/H-) людини), химерне антитіло #4LD (химерне антитіло проти BST2(D+/H-) людини; дивись Приклади 5 та 6), мишаче антитіло проти HM1.24 та гуманізоване антитіло проти HM1.24 (патентний документ 3, WO 2002/064159; патентний документ 4, WO 2005/034994). У цьому експерименті зразки отримали, застосовуючи мишачий IgG2a замість антитіла проти BST2, та їх застосовували як контрольні зразки.

Потім суспензії центрифугували (умови центрифугування: 250 G протягом 4 хвилин). Культуральні надосадові рідини обережно зібрали, так щоб не забруднити клітини. Рівні LDH у культуральних надосадових рідинах визначили за традиційним способом. Рівень LDH визначили як "кількість витоку LDH з клітин-мішеней внаслідок цитотоксичної активності (експериментальний зразок)".

Параметри, описані нижче, які є подібними до параметрів, описаних у (B-2), також застосовували для визначення ADCC:

- кількість LDH, що спонтанно вивільнилася з клітин-мішеней (спонтанне вивільнення LDH з клітин-мішеней): отримали шляхом культивування такого ж самого об'єму клітин-мішеней самих по собі, що і зразків;

- кількість максимального вивільнення LDH з клітин-мішеней (максимальне вивільнення LDH з клітин-мішеней): отримали шляхом культивування такого ж самого об'єму клітин-мішеней самих по собі, що і зразків. За 60 хвилин до збирання надосадових рідин додали розчин TritonX-100, що додається до набору, з кінцевою концентрацією 0,8 %;

- кількість LDH, що спонтанно вивільняється з ефекторних клітин (спонтанне вивільнення LDH з ефекторних клітин): отримали шляхом культивування такого ж самого об'єму ефекторних клітин самих по собі, що і зразків;

- контроль нормалізації рідкого об'єму (контроль корекції об'єму): отримали внаслідок додавання такого ж самого об'єму TritonX-100, як і при одержанні "максимального вивільнення

LDH з клітин-мішеней", до такого ж самого об'єму культурального середовища, що і у зразків. "Контроль корекції об'єму" позначається як "контроль об'єму" у формулі розрахунку ADCC (%), яку наведено нижче;

- 5 - контроль фоновому рівня у культуральному середовищі (фон культурального середовища):
приготували розчин такого ж самого об'єму, що і у зразків.

Абсорбцію кожного з "спонтанного вивільнення з клітин-мішеней", "максимального вивільнення з клітин-мішеней", "спонтанного вивільнення з ефektorних клітин" та "експериментального зразка" нормалізували шляхом віднімання абсорбції "фону культурального середовища".

- 10 ADCC підраховували згідно з наступною формулою:

Формула 2:

$$ADCC (\%) = \frac{[(\text{експериментальний зразок}) - (\text{спонтанне вивільнення з мішені}) - (\text{спонтанне вивільнення з ефektorних клітин})]}{[(\text{максимальне вивільнення з мішені}) - (\text{контроль об'єму}) - (\text{спонтанне вивільнення з мішені})]} \times 100$$

- 15 Результат наведено на Фіг. 4. Мишаче антитіло #4LD демонструвало сильну ADCC проти клітин BST2D-CHO. Активність порівнювали з активністю гуманізованого антитіла проти HM1.24. З іншого боку, мишаче антитіло #4LD майже не демонструвало ADCC проти клітин PRM18266. Навпаки, химерне антитіло #4LD демонструвало сильну ADCC проти цих клітин, та виявили, що активність можна порівняти з активністю гуманізованого антитіла проти HM1.24.

- 20 Порівняльний приклад 1. CDC антитіла проти BST2(D+/H+) людини

Аналіз CDC здійснювали, застосовуючи мишаче антитіло проти HM1.24 людини згідно з таким самим способом, як описано у Прикладі 3.

- 25 Результат наведено на Фіг. 3, яка також включає результат Прикладу 3. Мишаче антитіло проти HM1.24 людини (антитіло проти BST2(D+/H+) людини) демонструвало сильну CDC як проти клітин BST2(H)-CHO, так і проти клітин BST2(D)-CHO, та ця активність була порівнянною між цими двома типами клітин. Мишаче антитіло проти BST2 #4LD людини (проти BST2(D+/H-) людини) демонструвало CDC, специфічну до клітин BST2(D)-CHO, але не демонструвало ефекту вбивання клітин стосовно клітин BST2(H)-CHO.

- 30 Приклад 4. Зв'язування антитіла проти BST2(D+/H-) людини з різними біологічними тканинами

А. Зв'язування з фракціями мононуклеарів периферійної крові людини та мавп сунотомоглус (далі позначається як "PBMC")

- 35 PBMC забарвили мишачим антитілом #4LD, міченим PE-міченим антитілом козла проти миші, та проаналізували за допомогою проточної цитометрії, застосовуючи традиційний спосіб. Реагенти та пристрої, що застосовувалися, перелічено нижче.

Проточна цитометрія (FACSCalibur тощо) (Becton Dickinson).

Вторинне антитіло: R-PE-кон'юговане специфічне поліклональне антитіло козла проти мишачого імуноглобуліну (множинна абсорбція) (BD Biosciences: 550589).

HISTOPAQUE-1077 (SIGMA H8889).

- 40 FcR-блокувальний реагент (Milteny Biotec 130-059-901).

RPMI1640, що містить 5 % FCS, пеніцилін-стрептоміцин та L-глутамін.

Розчин для лізису ACK (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2-7,4).

- 45 Кров розвели RPMI1640 (без FCS), завантажили на HISTOPAQUE-1077, а потім центрифугували зі швидкістю 1800 обертів за хвилину протягом 20 хвилин. Середній шар зібрали та до нього додали RPMI1640. Отриману суспензію центрифугували зі швидкістю 1800 обертів за хвилину протягом 10 хвилин. Надосадову рідину відсмоктали, а до клітинного осаду додали 1 мл розчину для лізису ACK. Після того, як отриману суспензію залишили відстоюватися на льоду протягом 3 хвилин, до неї додали RPMI1640 та суспензію центрифугували зі швидкістю 1200 обертів за хвилину протягом 5 хвилин. Надосадову рідину відсмоктали, а до клітинного осаду додали RPMI1640, щоб суспендувати PBMC. Клітини порахували та потім центрифугували зі швидкістю 1200 обертів за хвилину протягом 5 хвилин. Застосовуючи 20 % FcR-блокувальний реагент /1 % FCS/PBS, отримали суспензію PBMC з концентрацією 5×10^7 клітин/мл та додали 10-мкл аліквоту (5×10^5 клітин) до кожної комірки планшетів з 96 комірками з круглим дном. Потім 25 мкл 1 мкг/мл мишачого антитіла #4LD додали до кожної комірки. Після того, як планшети залишили відстоюватися при 4 °C у темряві протягом 15 хвилин, до них додали 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS. Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин. Після того, як отримані надосадові рідини відкинули, додали PBS, що містив 1 % FCS, та планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин. Отримані надосадові рідини відкинули. 20 мкл вторинного антитіла додали до кожної комірки. Після того, як планшети
- 60

залишили відстоюватися при 4 °C у темряві протягом 15 хвилин, до них додали 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS. Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин та отримані надосадові рідини відкинули. Клітини суспендували у 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS, та перенесли до пробірок FACS. Потім до пробірок додали 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS. Згідно з аналізом з FACSCalibur, визначили відсоткове співвідношення забарвлюючих PBMC, застосовуючи програмне забезпечення FlowJo. Результат наведено у Таблиці 1.

В. Гістохімічне забарвлення заморожених зрізів тканини селезінки людини

Заморожені зрізи тканини селезінки людини забарвили мишачим антитілом #4LD, міченим полімерним реагентом (DAKO K5007), згідно з традиційним способом. Мікрофотографії тканини наведено на Фіг. 5. Мишаче антитіло #4LD ледь зв'язувалося з селезінковою тканиною людини. Навпаки, мишаче антитіло #19LD, описане у розділі "Порівняльний приклад", добре зв'язувалося з селезінковою тканиною людини. Цей результат демонструє, що мишаче антитіло #4LD є більш специфічним порівняно з мишачим антитілом #19LD.

С. Зв'язування з клітинами RPMI8226, що походять з мієломи

Клітини RPMI8226 забарвили мишачим антитілом #4LD, мишачим антитілом #19LD та антитілом проти HM1.24 з концентраціями 0,01, 0,1, 1 та 10 мкг/мл. Застосовуючи програмне забезпечення Prism 4, розраховували константи рівноваги-дисоціації (K_d) на основі визначеного відсоткового співвідношення забарвлення.

Реагенти та пристрої, що застосовуються, перелічено нижче.

Програмне забезпечення Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

Програмне забезпечення FlowJo (Tree Star, Inc.).

Проточна цитометрія (FACSCalibur тощо) (Becton Dickinson).

Вторинне антитіло: FITC мишачого Ig (кон'юговане з флуоресцинізотіоціанатом специфічне поліклональне антитіло козла проти мишачого імуноглобуліну (множинна адсорбція); BD Biosciences: 554001) тощо.

Клітини зібрали та порахували, а потім суспендували при 1×10^6 клітин/мл у PBS, що містив 1 % FCS. Суспензію додали до планшетів з 96 комірками з v-подібним дном по 100 мкл/комірку (1×10^5 клітин/комірку). Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин, а отримані надосадові рідини відкинули. До кожної комірки додали 25-мкл аліквоти у 0,01, 0,1, 1 або 10 мкг/мл мишачого антитіла #4LD, мишачого антитіла #19LD або антитіла проти HM1.24. Після того, як планшети залишили відстоюватися у темряві при 4 °C протягом 15 хвилин, до них додали 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS. Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин та отримані надосадові рідини відкинули. Додали PBS, що містив 1 % FCS, та планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин. Отримані надосадові рідини відкинули. Вторинне антитіло додали по 20 мкл/комірку. Після того, як планшети залишили відстоюватися у темряві при 4 °C протягом 15 хвилин, до них додали 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS. Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин та отримані надосадові рідини відкинули. Додали 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS. Планшети центрифугували зі швидкістю 2000 обертів за хвилину протягом 2 хвилин та отримані надосадові рідини відкинули. Клітини суспендували у 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS, та перенесли до пробірок FACS. Потім 150 мкл PBS, що містив 1 % FCS, додали до комірок для промивання, а потім перенесли до пробірок. Завдяки аналізу за допомогою FACSCalibur визначили відсоткове співвідношення забарвлюючих PBMC із застосуванням програмного забезпечення FlowJo. Крім того, застосовуючи програмне забезпечення Prism 4, розраховували значення K_d на основі визначеного відсоткового співвідношення забарвлення. Результат наведено у Таблиці 2. Мишаче антитіло #4LD демонструвало високу афінність до клітин RPMI8226 порівняно з антитілом проти HM1.24 та мишачим антитілом #19LD.

Порівняльний приклад 2. Зв'язування антитіла проти BST2(D+/H+) людини з різними біологічними тканинами

Такий самий експеримент, який описано у Прикладі 4, здійснювали, застосовуючи мишаче антитіло #19LD або антитіло проти HM1.24 замість мишачого антитіла #4LD. Результат наведено у Таблицях 1 та 2 та на Фіг. 5, які також включають результат Прикладу 4.

Таблиця 1

Зв'язування антитіла проти BST2 людини з PBMC людини та мавп cynomolgus

	Приклад 4	Порівняльний приклад 2	
	Антитіло проти BST2(D+/H-) людини	Антитіло проти BST2(D+/H-) людини	
	Мишаче антитіло #4LD	Мишаче антитіло #19LD	Антитіло проти HM1.24
Людина	6 %	60 %	99 %
Мавпа cynomolgus	3 %	85 %	96 %

Таблиця 2

Зв'язувальна активність (значення Kd) з клітинами RPMI8226, що походять від мієломи людини

Приклад 4	Порівняльний приклад 2	
Антитіло проти BST2(D+/H-) людини	Антитіло проти BST2(D+/H-) людини	
Мишаче антитіло #4LD	Мишаче антитіло #19LD	Антитіло проти HM1.24
0,1 нМ	0,93 нМ	0,24 нМ

Було продемонстровано, що мишаче антитіло #4LD, яке є антитілом проти BST2(D+/H-) людини, сильно зв'язується з клітинами, що є терапевтичними мішенями, такими як клітини мієломи, але, навпаки, його зв'язування з клітинами, що не є мішенями у цьому винаході, такими як PBMC та HUVEC, було дуже слабким. Отже, зниження рівня антитіла проти BST2 людини у крові після введення можна попередити, коли антитіло проти BST2(D+/H-) людини застосовується як антитіло проти BST2 людини. У цьому випадку антитіло ймовірно постачається при високих концентраціях до тканин, які є терапевтичними мішенями.

Приклад 5. Побудова химерного антитіла проти BST2(D+/H-) (химерне антитіло #4LD)

А. Ізотипування константної ділянки

Ізотипування константної ділянки мишачого антитіла #4LD, що продукується гібридомою, здійснювали, застосовуючи культуральну надосадову рідину та набір для ізотипування мишачого моноклонального антитіла (Serotec Product; номер за каталогом MMT1), який є у продажу. Визначили, що константні ділянки важкого та легкого ланцюгів були Igγ2a та Igκ, відповідно.

В. Клонування кДНК, що кодує варіабельну ділянку мишачого #4LD

(В-1) Гібридома, що застосовується при клонуванні кДНК

Гібридома, що застосовувалася, була гібридомою #4LD, що продукує мишаче антитіло проти BST2D людини.

(В-2) Виділення повної РНК

Повну РНК виділили з гібридоми, описаної вище у розділі (А-1), застосовуючи комерційно доступний набір "RNeasy Mini Kit" (Qiagen; номер за каталогом 74106) згідно з інструкцією, доданою до набору. У кожній групі отримали приблизно 200 мкг повної РНК з 1×10^7 гібридом.

(В-3) Ампліфікація та фрагментація кДНК, що кодує мишачу варіабельну ділянку важкого ланцюга

Комплементарну ДНК, що кодує мишачу варіабельну ділянку важкого ланцюга, ампліфікували за допомогою 5'RACE, застосовуючи 5-мкг аліквоту повної РНК, виділеної, як описано у розділі (В-2). Ампліфікацію здійснювали, застосовуючи комерційно доступний набір "Системи 5'RACE для швидкої ампліфікації кінців кДНК" (5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ENDS), набір версії 2.0 (Version 2.0 Kit) (Invitrogen; номер за каталогом 18374-058). Процедурі докладно описано нижче. На першому етапі кДНК з першим ланцюгом синтезували ревертазою з повної РНК, отриманої, як описано у розділі (А-2). Антисмисловий праймер (GSP1), що застосовується у синтезі першого ланцюга, вказаний нижче (SEQ ID NO: 14). Потім повну РНК перетравлювали за допомогою RNaseH, а одноланцюгову кДНК першого ланцюга, яка залишилася непошкодженою, очистили із застосуванням 1,5 % агарози з низькою точкою плавлення. Далі, нуклеотидний гомополімер dC додали до 3'-кінця кДНК першого ланцюга, застосовуючи термінальну дезоксинуклеотидилтрансферазу (TdT). Цю кДНК потім

ампліфікували шляхом PCR (ПЛР, полімеразно-ланцюгової реакції), застосовуючи якірний праймер (SEQ ID NO: 16) з нуклеотидним полімером, який є комплементарним до dC (якірна послідовність) на його 3'-кінці, та антисмисловий праймер (GSP2) (SEQ ID NO: 15), наведений нижче. Застосовуючи отриманий внаслідок ПЛР продукт як матрицю, кДНК далі ампліфікували шляхом вставленої ПЛР із застосуванням праймера AUAP (SEQ ID NO: 17) та антисмислового праймера (GSP2) (SEQ ID NO: 15). Потім продукт ПЛР очистили, застосовуючи 1,5 % агарозу з низькою точкою плавлення.

Mu IgG2aVH5RACE-GSP1 (SEQ ID NO: 14)

5' TCC AGA GTT CCA GGT CAA GGT CAC 3' (24-мер)

Mu IgG2aVH5RACE-GSP2 (SEQ ID NO: 15)

5' GCC AGT GGA TAG ACC GAT GG 3' (20-мер)

Якірний праймер 5' RACE (SEQ ID NO: 16)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3' (36-мер)

Праймер 5' RACE AUAP (SEQ ID NO: 17)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3" (20-мер)

(B-4) Ампліфікація та фрагментація кДНК, що кодує мишачу варіабельну ділянку легкого ланцюга

За допомогою такої ж самої процедури, описаної у розділі (B-3), кДНК, що кодує мишачу варіабельну ділянку легкого ланцюга, ампліфікували із повної РНК, виділеної, як описано у розділі (B-2). Для цієї ампліфікації антисмислові праймери, що застосовувалися, наведені нижче. Отриманий внаслідок ПЛР продукт очистили із застосуванням 1,5 % агарози з низькою точкою плавлення.

Mu IgVL5RACE-GSP1 (SEQ ID NO: 18)

5' TTC ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT 3' (24-мер)

Mu IgVL5RACE-GSP2 (SEQ ID NO: 19)

5' GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC 3' (21-мер)

(B-5) Визначення нуклеотидної послідовності кДНК та ідентифікація CDR

Кожен з фрагментів кДНК варіабельних ділянок важкого ланцюга та легкого ланцюга, які отримали, як описано у розділах (B-3) та (B-4), відповідно, клонували у вектор pCR4Blunt-TOPO, застосовуючи комерційний набір Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen; номер за каталогом 1325137) згідно з інструкцією, доданою до набору. Отримані вектори ввели у компетентні клітини *E. coli*, щоб отримати трансформанти *E. coli*. Плазмід, які описано вище, виділили з цих трансформантів. Нуклеотидні послідовності кДНК у плазмідах визначили, застосовуючи автоматичний секвенатор ДНК, генетичний аналізатор на основі ПЛР ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Неактивні транскрипти РНК, як результат зсувів рамок, антисмислових мутацій або їм подібного, поряд з гіперваріабельними ділянками (далі позначені як "CDR"), виключили, а транскрипти з правильними послідовностями екстрагували. Крім того, пошук гомології нуклеотидних послідовностей кДНК у плазмідах проти Kabat Database здійснювали, щоб ідентифікувати CDR варіабельних ділянок та послідовності відповідних варіабельних ділянок.

Нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого антитіла #4LD, отриману, як описано у розділі (B-3), представлено у SEQ ID NO: 10, а амінокислотну послідовність представлено у SEQ ID NO: 11. Амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 та CDR3 у варіабельній ділянці важкого ланцюга мишачого антитіла #4LD представлено у SEQ ID NO: 4, 5 та 6, відповідно.

Нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого антитіла #4LD, отриману, як описано у розділі (B-4), представлено у SEQ ID NO: 12, а амінокислотну послідовність представлено у SEQ ID NO: 13. Амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 та CDR3 у варіабельній ділянці легкого ланцюга мишачого антитіла #4LD представлено у SEQ ID NO: 7, 8 та 9, відповідно.

С. Клонування кДНК, що кодує константну ділянку IgG людини

Константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини та константну ділянку легкого ланцюга IgG1 людини вибрали з бібліотеки кДНК клітин, що виробляють інтерферон людини (клітини, що виробляють інтерферон; IPC). Кожну кДНК клонували у вектор pCR4Blunt-TOPO, застосовуючи комерційний набір Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen; номер за каталогом 1325137) згідно з інструкцією, що додається до набору. Отримані вектори ввели у компетентні клітини *E. coli*, щоб отримати трансформанти *E. coli*. Плазмід, які описано вище, виділили з трансформантів. Нуклеотидні послідовності кДНК у плазмідах визначили, застосовуючи автоматичний секвенатор ДНК, генетичний аналізатор на основі ПЛР ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

Д. Зшивання варіабельної та константної ділянок та клонування

Із варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого антитіла #4LD, яку отримали, як описано у розділі (B-5), та константної ділянки важкого ланцюга IgG людини, яку отримали, як описано у розділі C, зробили послідовність ДНК з перекриттям. Отже, дволанцюгову ДНК отримали, застосовуючи цю ділянку згідно зі способом розширення перекривання. Процедуру описано докладно нижче.

(D-1) Побудова кДНК, що кодує важкий ланцюг химерного антитіла #4LD

"Плазмиду, що несе кДНК, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга мишачого антитіла #4LD", яку отримали, як описано у розділі (B-5), перетравлювали рестрикційними ферментами NotI та XbaI та очистили, застосовуючи 1,5 % агарозний гель. ДНК розчинили з концентрацією 100 пмоль/мкл у буфері TE, щоб отримати розчин фрагмента кДНК, який кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга мишачого антитіла #4LD. Склад буферу TE вказано нижче.

Буфер TE:
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 7,5-8,0.

Крім того, "плазмиду, що несе кДНК, яка кодує константну ділянку важкого ланцюга IgG людини", яку отримали, як описано у розділі C, обробляли згідно з такою ж самою процедурою. Внаслідок цього отримали розчин 100 пмоль/мкл кДНК. Потім дві кДНК поєднали разом та інкубували при 70 °C протягом 10 хвилин, а потім при 37 °C протягом 5 хвилин, щоб утворити водневі зв'язки у ділянці, що перекривається. Після ампліфікації шляхом ПЛР отриману кДНК обробили рестрикційними ферментами NotI та XbaI та очистили, застосовуючи 1,5 % агарозу з низькою точкою плавлення.

Відповідні праймери, які застосовувалися при ампліфікації шляхом ПЛР для побудови векторів експресії для важкого та легкого ланцюгів химерного антитіла #4LD, перелічено нижче.

Праймери ПЛР для важкого ланцюга химерного антитіла #4LD:

4LD-VH NotI-1F (SEQ ID NO: 29)

5' AAA GCG GCC GCG CCG CCA CCA TGA AAG TGT TGA GTC TGT TGT ACC TGT TG 3' (50-мер)

4LD-VH XbaI-2R (SEQ ID NO: 30)

5' CTA GTC TAG ATG AGG AGA CTG TGA GAG TGG TGC CTT GGC 3' (39-мер)

4LD-VH-3F (SEQ ID NO: 31)

5' GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC 3' (33-мер)

4LD-VH-4R (SEQ ID NO: 32)

5' TGA TCA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT CTT C 3' (37-мер)

Праймери ПЛР для легкого ланцюга химерного антитіла #4LD:

4LD-VL NotI-1F (SEQ ID NO: 33)

5' AAA GCG GCC GCG CCG CCA CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TGC 3' (42-мер)

4LD-VL XbaI-2R (SEQ ID NO: 34)

5' CTA GTC TAG ACG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC CCC TCC G 3' (40-мер)

4LD-VL-3F (SEQ ID NO: 35)

5' AAA TAA AAC GAA CTG TGG CTG CAC CAT CTG TCT TCA TCT TCC C 3' (43-мер)

4LD-VL-4R (SEQ ID NO: 36)

5' TGA TCA CTA GCA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT TGT GAC 3' (39-мер)

(D-2) Отримання кДНК, що кодує легкий ланцюг химерного антитіла #4LD

кДНК, що кодує легкий ланцюг химерного антитіла #4LD, отримали таким самим способом, який описано у розділі (D-1), з варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого антитіла #4LD, отриманої, як описано у розділі (B-5), та з константної ділянки легкого ланцюга IgG людини, отриманої, як описано у розділі C.

(D-3) Клонування

кДНК, отриману, як описано у розділі (D-1), клонували у плазмідний вектор pcDNA3.1-zeocin (Invitrogen) на сайті клонування між NotI та XbaI, щоб побудувати вектор експресії для важкого ланцюга химерного антитіла #4LD. Крім того, кДНК, отриману, як описано у розділі (D-2), клонували у плазмідний вектор pcDNA3.1-гіроміцин (Invitrogen) на сайті клонування між NotI та XbaI, щоб побудувати вектор експресії для легкого ланцюга химерного антитіла #4LD. Кожен вектор було названо наступним чином.

Вектор експресії для важкого ланцюга химерного антитіла #4LD: pcDNA-4LDVH

Вектор експресії для легкого ланцюга химерного антитіла #4LD: pcDNA-4LDVL

Е. Експресія химерного антитіла #4LD

(E-1) Тимчасова трансформація

Застосовуючи набір Effectine Transfection Kit (Qiagen; номер за каталогом 301427), клітини 293T піддали ко-трансфекції 1 мкг кожного з векторів експресії для важкого ланцюга (pcDNA-4LDVH) та легкого ланцюга (pcDNA-4LDVL) химерного антитіла #4LD, отриманих, як описано у розділі (D-3). Потім клітини культивували при 37 °C, застосовуючи DMEM з додаванням 2 % FBS з низьким IgG. Склад середовища показано нижче.

- 5 DMEM з додаванням 2 % FBS з низьким IgG:
 DMEM (Sigma; номер за каталогом D5796)
 2 % FBS з низьким IgG (HyClone; номер за каталогом SH30151.03)
 2 мМ L-глутаміну
 10 100 одиниць/мл пеніциліну
 100 мкг/мл стрептоміцину
 pH 7,2-7,4.

Клітини культивували протягом 96 годин після введення вектора. Культуральні надосадові рідини зібрали та центрифугували, щоб видалити клітинний дебрис. Отримані надосадові рідини застосовували як сирі розчини антитіла.

F. Очищення антитіла

Кожен з сирих розчинів антитіла, отриманих, як описано у розділі (E-1), очистили, застосовуючи афінну колонку білка A (rProtein A Sepharose FF, Amersham Pharmacia; номер за каталогом 17-1279-01). Умови очищення із застосуванням колонки описано нижче. Антитіла афінно очистили згідно з інструкцією, що додається до колонки, застосовуючи при цьому буфер PBS(-) як буфер адсорбції та 0,1 М буфер цитрату натрію (pH 3) як буфер елюювання. Склад буферу PBS(-) наведено нижче. pH елююваних фракцій довели до приблизно 7,2 шляхом додавання 1 М Tris-HCl (pH 8,0). Буфер кожного з отриманих розчинів антитіла замістили PBS(-), застосовуючи мембрану для діалізу (відрізання 10000; PIERCE). Отримали очищене химерне антитіло #4LD.

Концентрацію очищених антитіл визначили шляхом вимірювання абсорбції при 280 нм та розрахунку на основі перетворення 1,38 OD (оптичної густини) в 1 мг/мл.

Буфер PBS(-)

- 0,2 г/л дигідрофосфату калію
 0,2 г/л хлориду калію
 8 г/л хлориду натрію
 1,15 г/л безводного гідрофосфату натрію.

Відповідні нуклеотидні та амінокислотні послідовності побудованих важкого та легкого ланцюгів химерного антитіла #4LD наведено у наступних SEQ ID.

Важкий ланцюг	Легкий ланцюг
SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 27
(нуклеотидна послідовність)	(нуклеотидна послідовність)
SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 28
(амінокислотна послідовність)	(амінокислотна послідовність)

Приклад 6. Визначення епітопу, що розпізнається антитілом проти BST2(D+) людини

A. Побудова векторів експресії для білків BST2 людини та отримання рекомбінантних білків BST2 людини

Шляхом ПЛР синтезували ряд кДНК, що кодують ряд часткових амінокислотних послідовностей зовнішньоклітинного домену від позиції 47 до позиції 180 в усій послідовності BST2D людини (SEQ ID NO: 2). Ряд часткових амінокислотних послідовностей побудували як усічення на N- та C-кінцях, отримані внаслідок успішної делеції єдиної амінокислотної послідовності з кожного кінця. Спосіб побудови амінокислотних послідовностей, які представляють інтерес, описано нижче.

Побудова амінокислотних послідовностей для N-кінцевого аналізу:

(47)----- (180)
 (47)----- (179)
 (47)----- (178)

:

:

(47)----- (140)

Побудова амінокислотних послідовностей для C-кінцевого аналізу:

(47)----- (180)
 (48)----- (180)
 (49)----- (180)
 :
 :
 (140)----- (180)

ПЛР здійснювали, застосовуючи праймери, кожен з яких гібридизується з будь-яким кінцем ділянки, що кодує амінокислотну послідовність-мішень у межах нуклеотидної послідовності кДНК, що кодує BST2D людини (SEQ ID NO: 1). Сайти EcoRI та XhoI додали до кожного праймеру. ПЛР здійснювали, застосовуючи полімеразу KOD DNA від Toyobo та вектор з вставленою кДНК повної довжини BST2 людини як матрицю. Отримані внаслідок ПЛР продукти розщепили EcoRI та XhoI (TaKaRa), їх піддали електрофорезу на агарозному гелі, а потім очистили за допомогою MinElute від Qiagen. Очищені продукти ПЛР клонували у рET32 (Novagen), а His-мічений вектор експресії між сайтами EcoRI та XhoI. Вектори експресії ввели у E. coli (BL21 (DE3)) для трансформації. Білки BST2 людини, кожен з яких має His-мітку на його N-кінці, отримали з відповідних штамів E. coli, застосовуючи Overnight Express System (Novagen).

B. Антитіло

Застосовуючи мишаче антитіло #4LD, отримане, як описано у "Прикладі 2", визначили епітопи шляхом вестерн-блотингу, як описано нижче.

C. Вестерн-блотинг

Кожен з білків His-міченого BST2 людини (синтезували, як описано у розділі A) розчинили у буфері для зразка, а потім нагрівали при 70 °C протягом 10 хвилин. Розчинені білки фракціонували на гелі з градієнтом 4-20 % SDS-PAGE (Invitrogen) та перенесли на мембрану PVDF (Millipore). Цю мембрану блокували за допомогою BSA та інкубували з 1 мкг/мл антитіла 4LD або розведеним у 2000 разів антитілом проти His-мітки (Novagen). Після реакції з HRP-міченим антитілом проти мишачого IgG (Jackson), реагент для детекції ECL (ECL Detection Reagent (GE Healthcare)) реагував для хімічної люмінесценції, та виявили His-мічені білки BST2 людини, застосовуючи LAS-1000 від Fuji Film.

Буфер для зразка:

Буфер для зразка NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen)

Відновлювальний агент NuPAGE Reducing Agent (10x) (Invitrogen).

Цей буфер приготували, застосовуючи стерильну дистильовану воду.

Результат наведено на Фіг. 6. Нижче наведено амінокислотну послідовність рекомбінантного білка BST2 людини у кожній смузі. Амінокислотні позиції пронумеровано, позначивши як 1 першу N-кінцеву амінокислоту M SEQ ID NO: 2. Зі смуг 3-9 для усічення на N-кінці (зверху, ліворуч) та смуг 4-10 для усічення на C-кінці (зверху, праворуч), смуги, у яких виявили сигнал з антитілом #4LD, позначили +, а смуги, у яких сигнал не виявлено, позначили -.

Усічення на N-кінці

1 : K (47) -Q (180)	2 : K (47) -D (159)	10 : K (47) -E (140)
+ 3 : K (47) -----P (155)		
+ 4 : K (47) -----D (150)		
+ 5 : K (47) -----A (149)		
+ 6 : K (47) -----I (148)		
+ 7 : K (47) -----R (147)		
- 8 : K (47) -----V (146)		
- 9 : K (47) -----S (145)		

Усічення на C-кінці

1 : M(96) - Q(180) 2 : L(116) - Q(180) 3 : Q(128) - Q(180)
 + 4 : S(131) - Q(180)
 + 5 : A(132) - Q(180)
 + 6 : E(133) - Q(180)
 - 7 : V(134) - Q(180)
 - 8 : E(135) - Q(180)
 - 9 : R(136) - Q(180)
 - 10 : L(137) - Q(180)

Як добре видно з Фіг. 6, зв'язування антитіла 4LD було виявлено на смузі 7 для усичення на N-кінці K(47)---R(147), але зв'язування не змогли виявити на смузі 8 для усичення на N-кінці K(47)---V(146). Це вказує на те, що R на позиції 147 є необхідним для розпізнавання антигену антитілом 4LD. З іншого боку, результат на усиченні на C-кінці (верхня ліва панель на Фіг. 6) демонструє, що антитіло 4LD зв'язується з E(133)---Q(180) на смузі 6, але зв'язування з V(134)---Q(180) не було виявлено. Це вказує на те, що E на позиції 133 є необхідним для розпізнавання антигену антитілом 4LD. Визначили, що епітоп, який розпізнається 4LD, становить 15 амінокислот EVERLRRENQVLSVR (SEQ ID NO: 37). Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 37 відповідає ділянці від позиції 133 до позиції 147 в амінокислотній послідовності повної довжини BST2D (SEQ ID NO: 2). Як показано на Фіг. 1, визначили, що цей епітоп складається людською BST2D-специфічною амінокислотою послідовністю.

Приклад 7. Тест ефективності ліків in vivo

(1) Клітинні лінії

Клітинні лінії, що застосовувалися, були клітинною лінією RPMI8226 (ATCC), що походить від мієломи людини, та лінією В-клітин людини ARH77 (ATCC). Клітини переносили та зберігали у RPMI1640 (SIGMA), до якого було додано 10 % FBS (BIONET).

(2) Отримання мишачої моделі з трансплантованою клітинною лінією RPMI8226 раку людини

Клітини приготували по 5×10^7 клітин/мл, застосовуючи середовище для перенесення клітин. За день до початку трансплантації клітин 100 мкл антитіла проти asialo GM1(Wako Pure Chemical Industries; одну пробірku розчинили у 5 мл) ввели до черевних порожнин мишей SCID (самців віком 5 тижнів) (CLEA Japan Inc.). 100 мкл клітинної суспензії (5×10^6 клітин/тварину) трансплантували підшкірно у абдомінальну ділянку мишей. Об'єм пухлини підраховували згідно з формулою, наведеною нижче, та модель було схвалено, коли об'єм пухлини сягав від 140 до 240 мм³.

(Об'єм пухлини) = (найбільша вісь) x (найменша вісь) x (найменша вісь) / 2

Мишей розподілили на групи згідно з об'ємом пухлин.

(3) Отримання мишачої моделі з трансплантованою клітинною лінією ARH77 раку людини

Клітини приготували по $2,5 \times 10^7$ клітин/мл, застосовуючи середовище для перенесення клітин. За день до початку трансплантації клітин 100 мкл антитіла проти asialo GM1(Wako Pure Chemical Industries; одну пробірku розчинили у 5 мл) ввели до черевних порожнин мишей SCID (самців віком 5 тижнів) (CLEA Japan Inc.). 200 мкл клітинної суспензії (5×10^6 клітин/тварину) трансплантували мишам через хвостову вену. Через 10 днів після трансплантації пухлин, за допомогою ELISA (дивись розділ "Аналіз білка М у сироватці") визначили рівні IgG людини у сироватці (білок М), який виробляється клітинами ARH77 у мишей. Модель запроваджували на підставі виявлення білка М у сироватці. Мишей розподілили на групи на підставі рівня білка М у сироватці.

(4) Аналіз білка М у сироватці

Кров взяли з дорсальної метатарзальної вени. Після відокремлення сироваток визначили рівні білка М у мишачих сироватках шляхом багатошарового ELISA, застосовуючи антитіло проти IgG людини. Більш детально, планшети з 96 комітками (Nunc) з імобілізованим антитілом проти IgG людини (Biosource) блокували буфером розведення (D.B.), а потім до них додали зразки сироватки, розведені відповідним чином із застосуванням буферу розведення. Склад буферу розведення наведено нижче.

Буфер розведення:

50 ммоль/л буферу Tris-HCl (pH 8,1), що містить:

1 ммоль/л MgCl₂,

150 ммоль/л NaCl,

0,02 % маса/об'єму NaN₃,

0,05 об'єму (%) Tween20 та

1 % маса/об'єму альбуміну бичачої сироватки (BSA).

Крім того, у якості стандартного зразка для визначення концентрації антитіла, подвійним

розведенням IgG людини (ICN/cappel) зробили серію з одинадцяти розведень, починаючи з 1000 нг/мл. До планшетів також додали стандартний зразок. Після реакції з міченим лужною фосфатазою антитілом проти IgG людини (Biosource) здійснювали виявлення кольору із застосуванням Sigma104 (Sigma-Aldrich) як субстрату, та отриману абсорбцію при 405 нм визначили із застосуванням планшет-ридера абсорбції (контрольна довжина хвилі: 635 нм). Рівні IgG людини (білка M) у зразках підраховували на основі калібрувальної кривої із застосуванням стандартного IgG людини. На основі калібрувальної кривої припустили, що границя детекції при ELISA становить 1 нг/мл.

(5) Приготування антитіла, яке слід вводити

У день введення приготували антитіло 4LD, застосовуючи PBS(-), стерилізований шляхом фільтрації, з концентрацією 0,5 мг/мл (група, якій вводили 5 мг/кг); 0,15 мг/мл (група, якій вводили 1,5 мг/кг); 0,1 мг/мл (група, якій вводили 1 мг/кг); та 0,05 мг/мл (група, якій вводили 0,5 мг/кг); та використовували для введення.

(6) Введення антитіла

Зразки, які приготували, як описано вище у розділі (5), ввели модельним мишам з трансплантованими клітинами RPMI8226, які підготували, як описано у розділі (2). Зразки вводили по 10 мл/кг (دوزи: 5, 1,5 та 0,5 мг/кг) через хвостову вену двічі на тиждень протягом трьох тижнів, починаючи з 27 дня після трансплантації. Як негативний контрольний зразок вводили PBS(-) (наповнювач) по 10 мл/кг через хвостову вену двічі на тиждень протягом трьох тижнів за такою ж самою процедурою. Кожна група включала шість мишей. Зразки, приготовані, як описано у розділі (5), вводили модельним мишам з трансплантованими клітинами ARH77, яких підготували, як описано у розділі (3). Зразки вводили по 10 мл/кг (دوزи: 5, 0,5 та 0,05 мг/кг) через хвостову вену один раз на тиждень протягом 3 тижнів, починаючи з 10 дня після трансплантації. Як негативний контрольний зразок вводили PBS(-) (наповнювач) по 10 мл/кг через хвостову вену один раз на тиждень протягом трьох тижнів за такою ж самою процедурою. Кожна група включала 5 мишей.

(7) Оцінка протипухлинного ефекту

Протипухлинний ефект антитіла 4LD на моделях мишей з трансплантованими клітинами RPMI8226 оцінювали на основі зміни об'єму пухлин за часом (Фіг. 7). Результат продемонстрував, що зростання пухлин пригнічувалося у групі, якій вводили антитіло 4LD, порівняно з групою, якій вводили наповнювач. Протипухлинний ефект на моделях мишей з трансплантованими клітинами ARH77 оцінювали на підставі періоду виживання (Фіг. 8). Результат показав, що період виживання подовжився у групі, якій вводили антитіло 4LD, порівняно з групою, якій вводили наповнювач.

Ці результати демонструють, що антитіло 4LD має протипухлинний ефект на моделях мишей, яким трансплантували клітини мієломи людини.

Промислова придатність

Цим винаходом пропонуються антитіла, які специфічно розпізнають BST2D серед різних варіантів сплайсingu антигену BST2 людини. Антитіла проти BST2 цього винаходу, які є більш специфічними до BST2D порівняно з традиційними антитілами проти HM1.24, можна застосовувати для лікування або діагностування тканин та клітин, що експресують BST2D, таких як мієлома. Наприклад, коли їх застосовують для лікування мієломи, тоді антитіла цього винаходу здатні зберігатися у крові на високих рівнях протягом більш тривалого періоду часу, ніж антитіла, які імунологічно не відрізняють BST2D від BST2H. Отже, антитіла цього винаходу можуть досягати терапевтичних ефектів навіть при нижчих дозах. Альтернативно, антитіла цього винаходу можна застосовувати як діагностичні засоби, здатні специфічно виявляти клітини, що експресують BST2D, такі як мієлома. Зокрема, коли їх застосовують *in vivo* при діагностуванні мієломи за допомогою зображення, тоді антитіла цього винаходу, які імунологічно розпізнають інші варіанти молекули BST2, є корисним засобом, який дозволяє отримати більш специфічні зображення з низькою фоновою поміхою стосовно уражень.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло проти BST2 людини, яке зв'язується з антигеном BST2D людини, але по суті не зв'язується з антигеном BST2H людини, в якому варіабельні ділянки важкого ланцюга та варіабельні ділянки легкого ланцюга містять як CDR1, CDR2 та CDR3 наступні амінокислотні послідовності:

CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SGYYWN (SEQ ID NO:4);

CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YISYDGSNNYNPSLKNR (SEQ ID NO:5); та

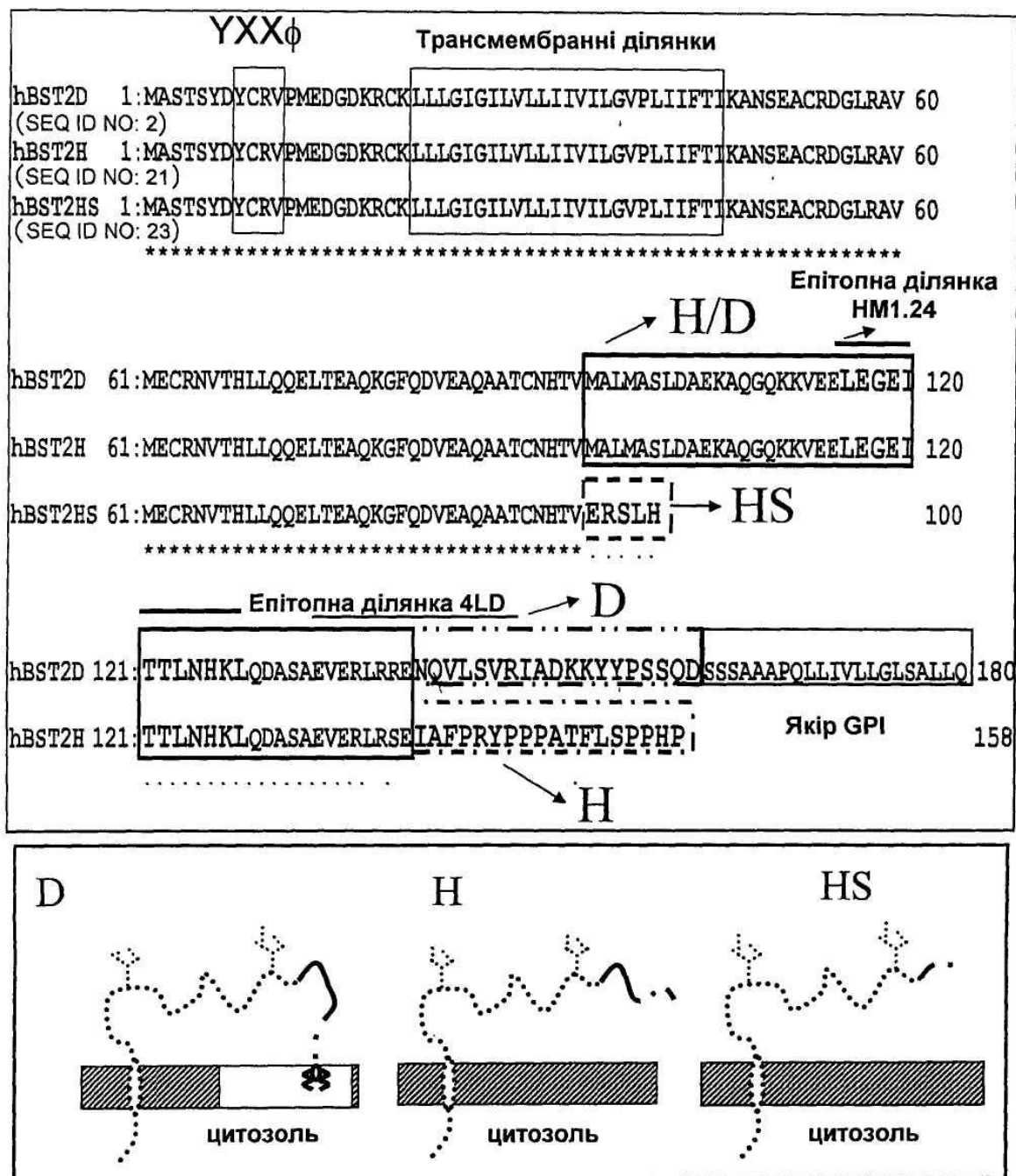
CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: ILGRGY (SEQ ID NO:6);

CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO:7);

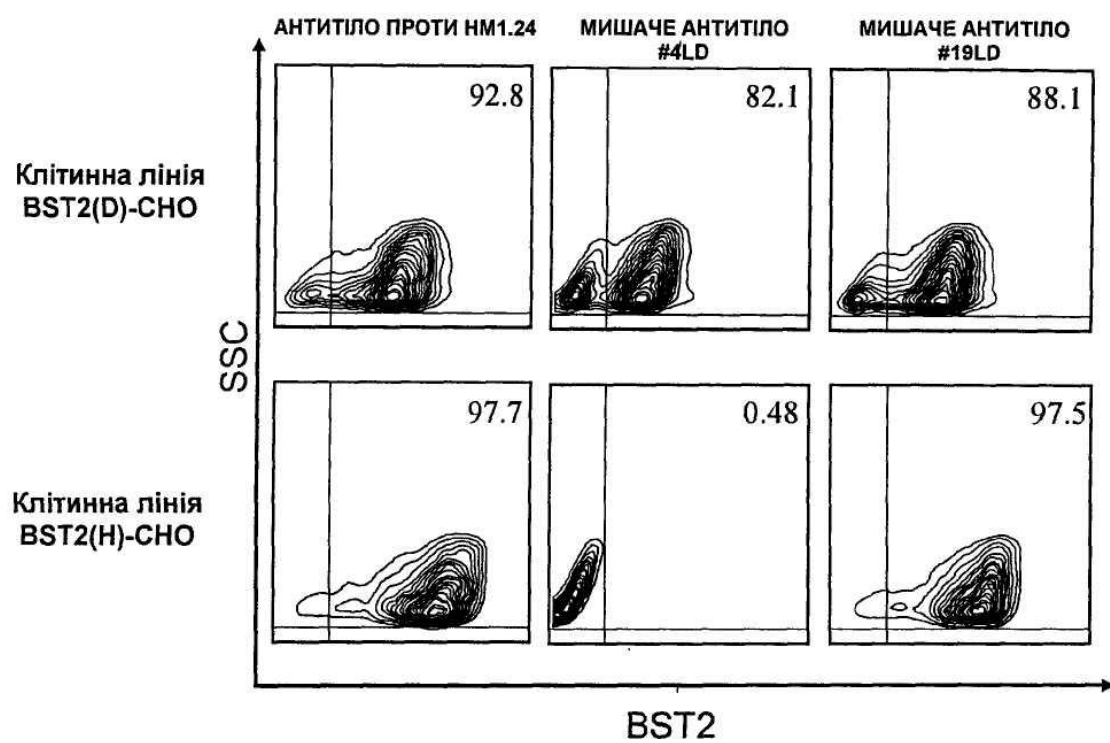
CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: YASNLES (SEQ ID NO:8) та

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QHSWEIPYT (SEQ ID NO: 9).

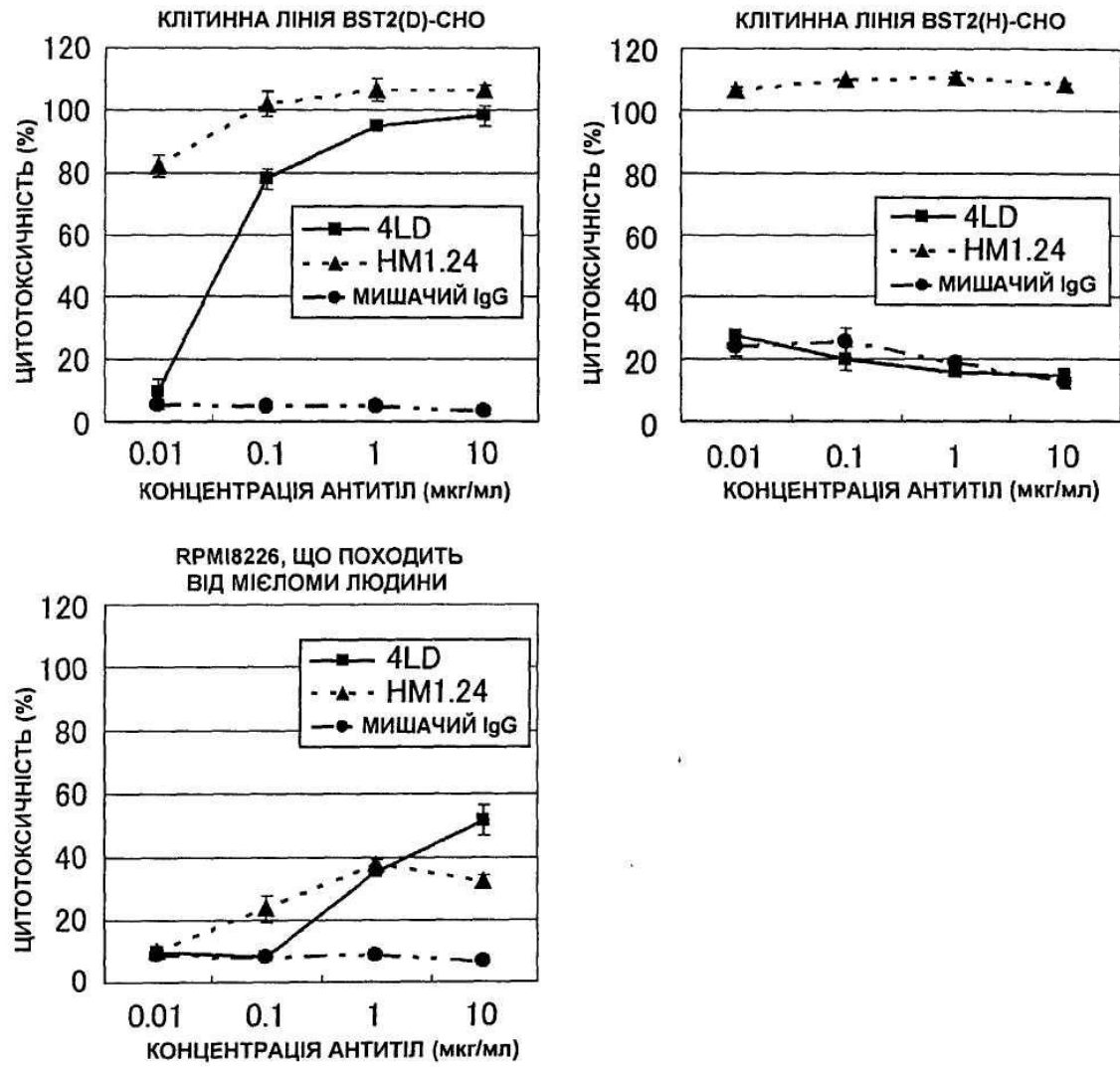
2. Антитіло проти BST2 людини, яке зв'язується з антигеном BST2D людини, але по суті не зв'язується з антигеном BST2H людини, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO:11 та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO:13.
3. Антитіло за п. 1 або 2, яке розпізнає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37 як епітоп.
4. Моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з BST2 людини, яке продукується гібридомною BST2#4LD, депонованою за номером доступу FERM BP-10964.
5. Антитіло за п. 1, яке є моноклональним антитілом.
6. Антитіло за п. 1 або 2, яке має CDC проти клітини, яка експресує антиген BST2D людини на клітинній поверхні.
7. Антитіло за п. 1 або 2, яке має ADCC проти клітини, яка експресує антиген BST2D людини на клітинній поверхні.
8. Полінуклеотид, який кодує антитіло за п. 1.
9. Вектор, який є носієм полінуклеотиду, який кодує антитіло за п. 1.
10. Трансформована клітина, яка розпізнає вектор за п. 9 як вектор експресії.
11. Спосіб одержання антитіла за п. 1, при цьому спосіб включає етапи культивування трансформованої клітини за п. 10 та збирання антитіла з культури.
12. Гібридомною BST2#4LD, яка продукує антитіло, що має зв'язувальну специфічність до BST2D людини, що депонована за номером доступу FERM BP-10964.
13. Спосіб одержання антитіла, який включає етапи культивування гібридомною за п. 12 та збирання антитіла з культури.
14. Спосіб виробництва специфічного антитіла проти BST2D людини, де антитіло розпізнає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37 як епітоп, який включає наступні етапи:
(1) контактування антитіла проти BST2D людини з одним або з обома BST2H людини та BST2HS людини та
(2) збирання як специфічного антитіла проти BST2D людини антитіла проти BST2D людини, яке має одну або обидві реакційні специфічності:
(i) не зв'язується з BST2H людини та
(ii) не зв'язується з BST2HS людини.
15. Терапевтичний засіб для лікування хвороби, спричиненої зростанням тканини, яка експресує антиген BST2D людини, при цьому терапевтичний засіб включає як активний інгредієнт антитіло за п. 1 або 2.
16. Терапевтичний засіб проти пухлини, яка експресує антиген BST2D людини, при цьому терапевтичний засіб включає як активний інгредієнт антитіло за п. 1 або 2.
17. Терапевтичний засіб за п. 16, де пухлина походить з клітини кісткового мозку.
18. Терапевтичний засіб за п. 17, де пухлина, що походить з клітини кісткового мозку, є мієломою.
19. Терапевтичний засіб за п. 18, де мієлома є множинною мієломою.
20. Діагностичний засіб для виявлення тканини, яка експресує антиген BST2D людини, який включає антитіло за п. 1 або 2.
21. Діагностичний засіб для виявлення пухлини, яка експресує антиген BST2D людини, який включає антитіло за п. 1 або 2.
22. Діагностичний засіб за п. 21, де пухлина походить з клітини кісткового мозку.
23. Діагностичний засіб за п. 22, де пухлина, що походить з клітини кісткового мозку, є мієломою.
24. Діагностичний засіб за п. 23, де мієлома є множинною мієломою.
25. Спосіб лікування пацієнта з пухлиною, що експресує антиген BST2D людини, який включає етап введення антитіла за п. 1 або 2.
26. Застосування антитіла за п. 1 або 2 для приготування фармацевтичної композиції для лікування пацієнта з пухлиною, що експресує антиген BST2D людини.



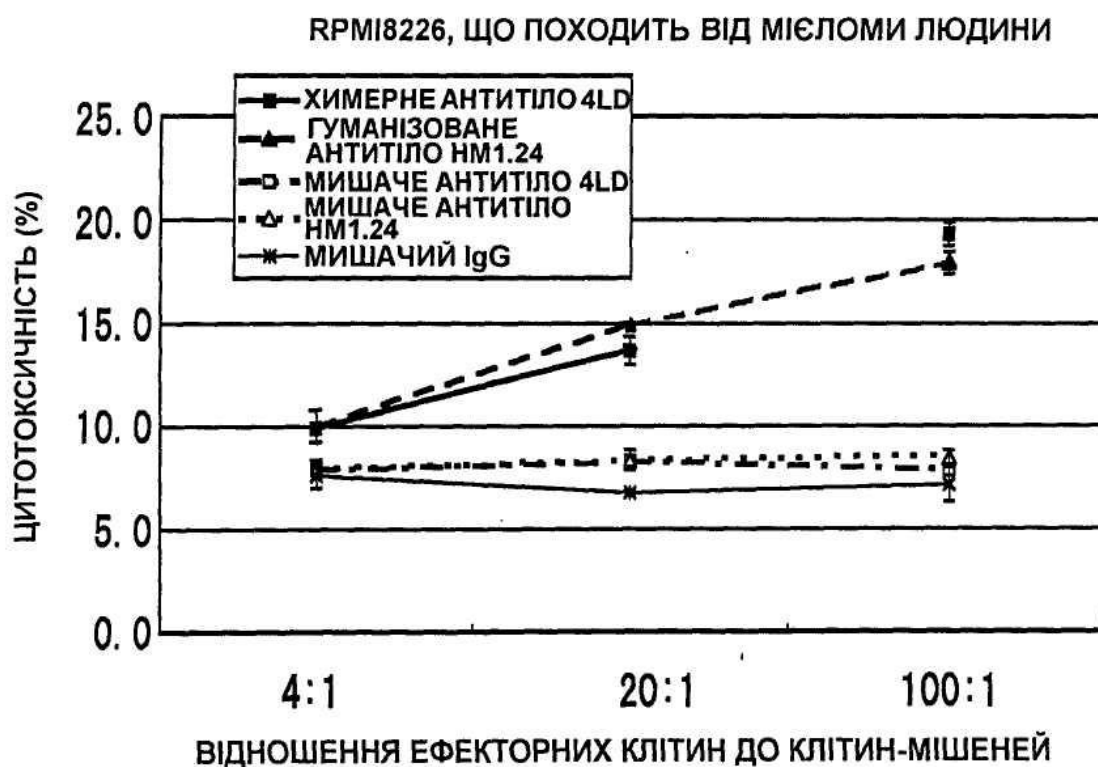
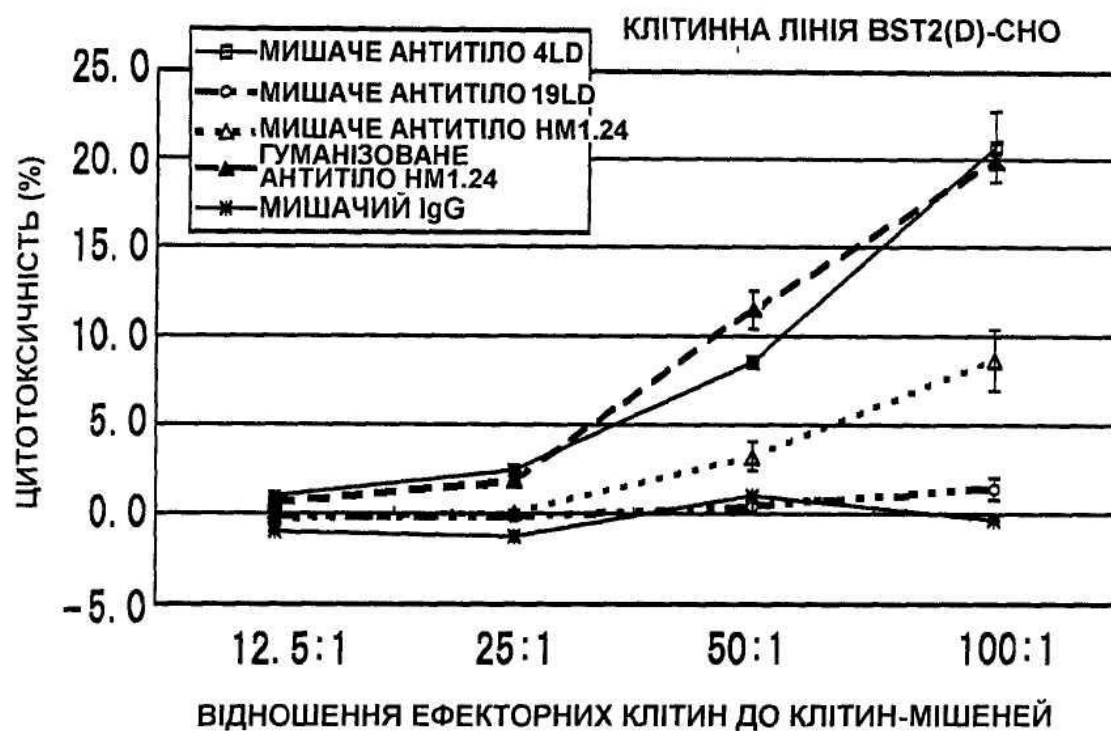
Фіг. 1



Фіг. 2



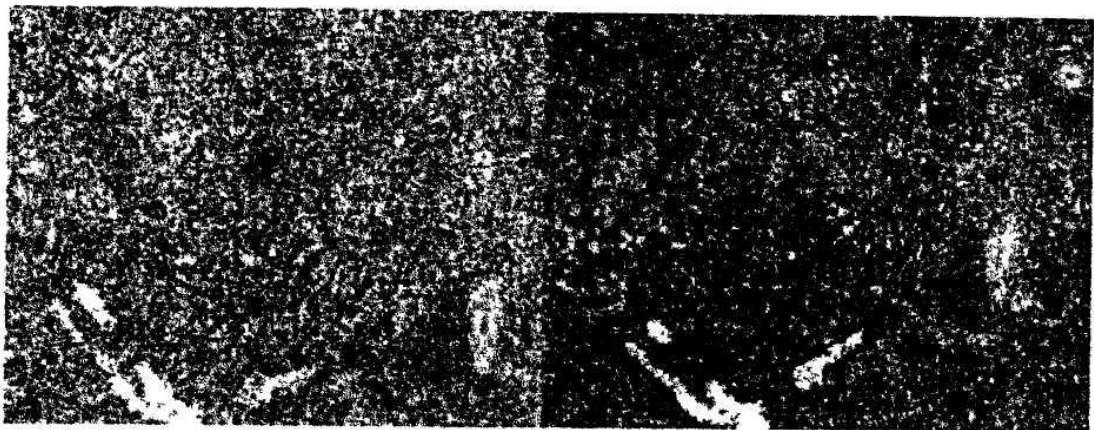
Фіг. 3



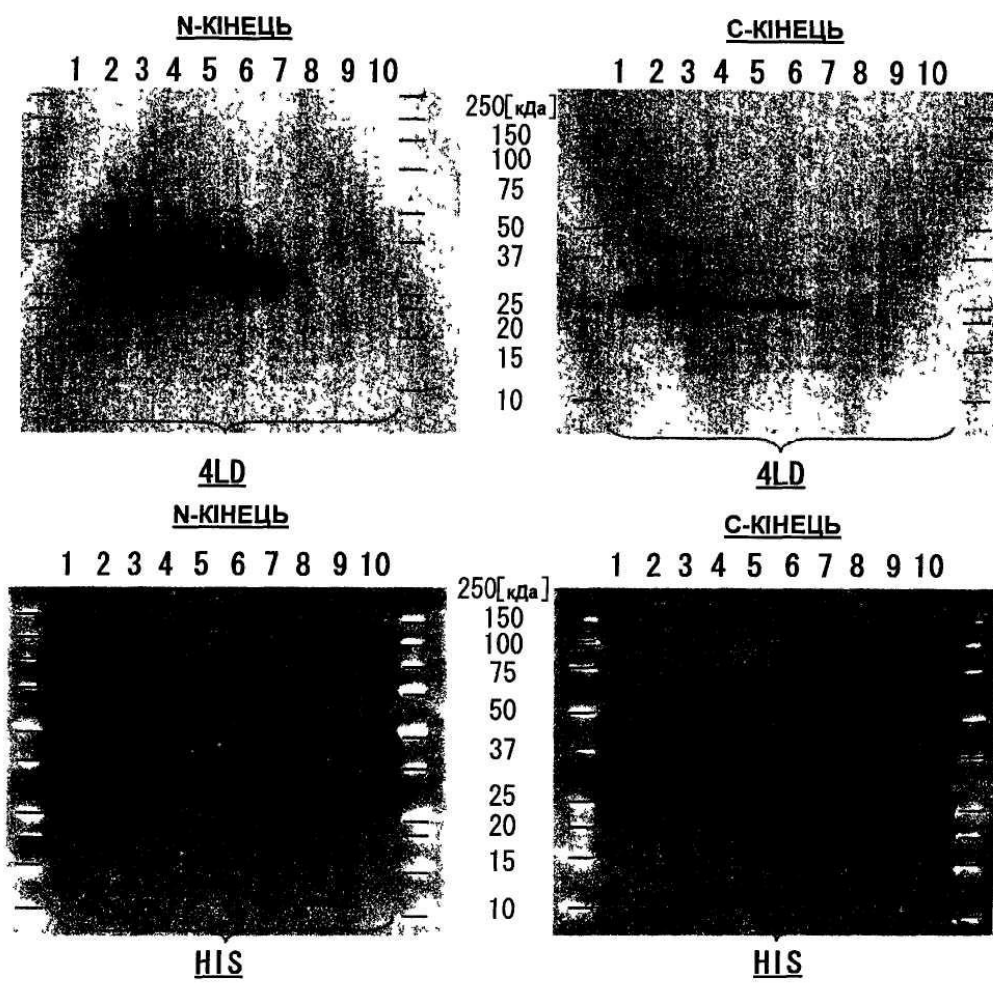
Фіг. 4

МИШАЧЕ АНТИТІЛО #4LD

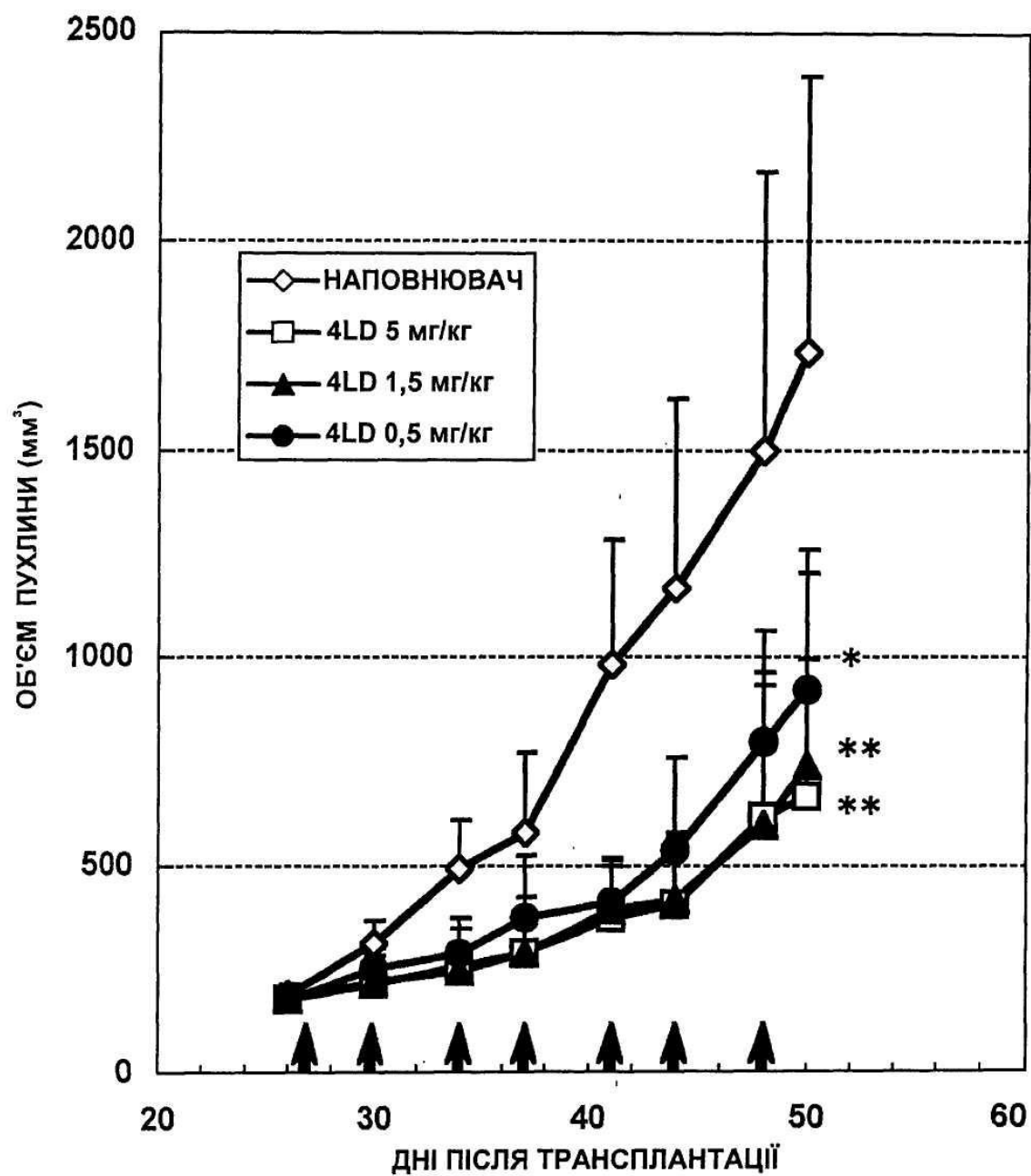
МИШАЧЕ АНТИТІЛО #19LD



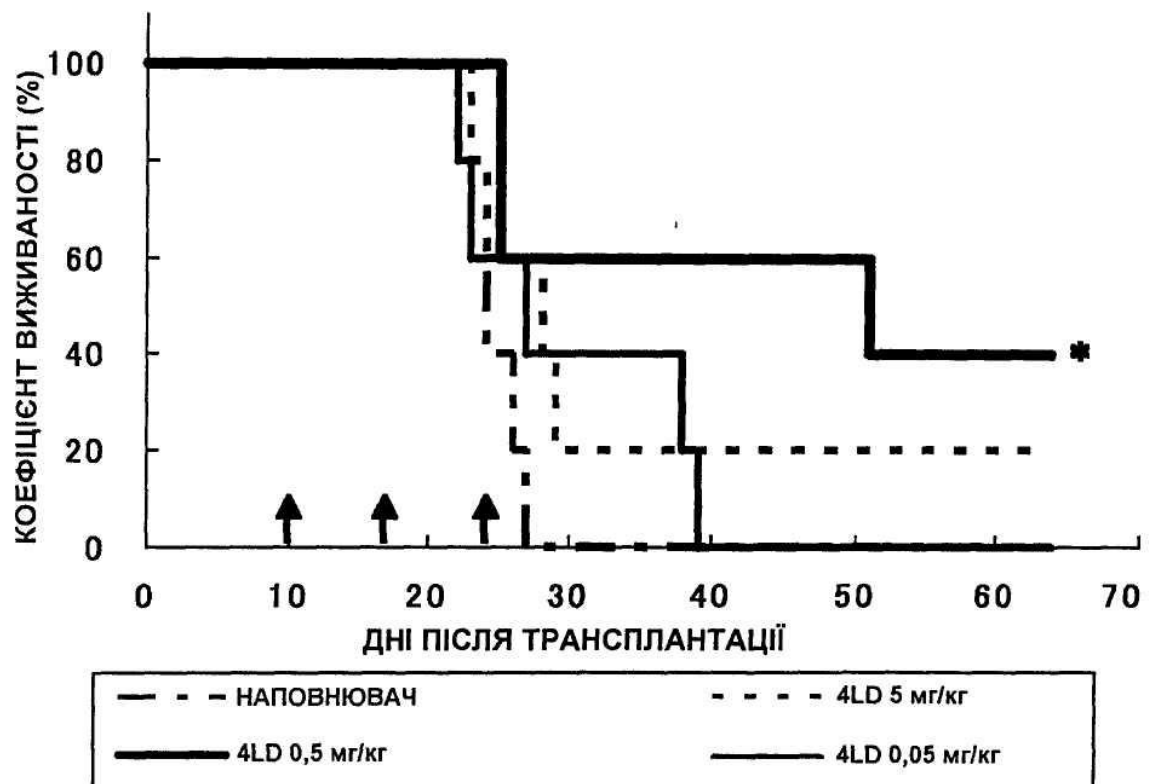
Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

<120> АНТИТІЛО ПРОТИ BST-2

<130> G2-A0701P

<150> JP 2007-269470

<151> 2007-10-16

<160> 37

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 866

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

$\langle 222 \rangle$ (4) .. (546)

<400> 1

tgg atg gca tct act tgg tat gac tat tgc aga gtg ccc atg gaa gac 48
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp
1 5 10 15

ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg ata gga att ctg gtg ctc 96
Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu
20 25 30

ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg att atc ttc acc atc aag 144
Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys
35 40 45

gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt 192
Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys
50 55 60

cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag 240
Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys
65 70 75

ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg 288
Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val
80 85 90 95

atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag 336
Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys
100 105 110

aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt 384
Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu
115 120 125

cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc 432
Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val
130 135 140

tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac 480

```

Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp
 145                      150                      155

tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg att gtg ctg ctg ggc ctc      528
Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu
160                      165                      170                      175

agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga agctggcaca tcttgaagg      576
Ser Ala Leu Leu Gln
                      180

tccgtcctgc tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc tcatcagttc tgagcgggtc      636
atggggcaac acggtttagcg gggagagcac ggggtagccg gagaagggcc tctggagcag      696
gtctggaggg gccatggggc agtctgggt gtggggacac agtcgggttg acccagggct      756
gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc tcttgtctcc caccctgaga      816
ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt tgttatgggt      866

<210> 2
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
 1                      5                      10                      15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
 20                      25                      30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
 35                      40                      45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
 50                      55                      60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
 65                      70                      75                      80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
 85                      90                      95

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
100                      105                      110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln
115                      120                      125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu
130                      135                      140

```

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser
145 150 155 160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser
165 170 175

Ala Leu Leu Gln
180

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser
1 5 10 15

Ser Gln Asp

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

Arg

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Ile Leu Gly Arg Gly Tyr
1 5

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Met	His
1				5					10					15

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9

Gln	His	Ser	Trp	Glu	Ile	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 10
 <211> 396
 <212> DHK
 <213> Mus musculus

<400> 10

atgaaagtgt tgagtctgtt gtacctgttg acagccattc ctggtatcct gtctgatgta	60
cagcttcagg agtcaggacc tggcctcgtg aaaccttctc agtctctgtc tctcacctgc	120
tctgtcactg gctactccat caccagtggg tattactgga actggatccg gcagtttcca	180
ggaaacaaac tggaatggat gggctacata agctacgacg gtagcaataa ctacaacca	240
tctctcaaaa atcgaatctc catcactcgt gacacatcta agaaccagtt tttcctgaag	300
ttgaattctg tgactactga ggacacagct acatattact gtgcaattct gggacgcggc	360
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tctcca	396

<210> 11
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Leu Gly Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 12
<211> 393
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 12
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctagct atagttatat gcaactggtac 180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 240
ggggtccctg ccagggtcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300
cctgtggagg aggaggatac tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 360
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 393

<210> 13
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 14
tccagagttc caggtcaagg tcac

24

<210> 15
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 15
gccagtgat agaccgatgg

20

<210> 16
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<220>
<221> модифікована основа
<222> (24)..(25)
<223> n являє собою інозин

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n являє собою a, c, g або t

```

<220>
<221> модифікована основа
<222> (29)..(30)
<223> п являє собою інозин

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> п являє собою а, с, г або т

<220>
<221> модифікована основа
<222> (34)..(35)
<223> п являє собою інозин

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 16
ggccacgcgt cgactagtagt gggnnngggnn gggnnng
36

<210> 17
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 17
ggccacgcgt cgactagtagt
20

<210> 18
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 18
ttcactgccg tcaatcttcc actt
24

<210> 19
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 19
gatggatasa gttggtgcag c
21

<210> 20
<211> 480
<212> ДНК

```


<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(480)

<400> 20

```

tgg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc aga gtg ccc atg gaa gac      48
  Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp
    1             5             10             15

ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg ata gga att ctg gtg ctc      96
Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu
              20             25             30

ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg att atc ttc acc atc aag      144
Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys
              35             40             45

gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt      192
Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys
              50             55             60

cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag      240
Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys
              65             70             75

ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg      288
Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val
      80             85             90             95

atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag      336
Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys
              100            105            110

aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt      384
Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu
              115            120            125

cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg agg tca gag ata gcc ttc      432
Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Ser Glu Ile Ala Phe
              130            135            140

ccc cgc tac cct cca cct gcc aca ttc ctc tca ccc cca cat ccc tag      480
Pro Arg Tyr Pro Pro Pro Ala Thr Phe Leu Ser Pro Pro His Pro
              145            150            155

```

<210> 21

<211> 158

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
  1             5             10             15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
    20             25             30

```

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
35 40 45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
50 55 60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
65 70 75 80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
85 90 95

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
100 105 110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln
115 120 125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Ser Glu Ile Ala Phe Pro
130 135 140

Arg Tyr Pro Pro Pro Ala Thr Phe Leu Ser Pro Pro His Pro
145 150 155

<210> 22
<211> 314
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (4)..(306)

<400> 22
tgg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc aga gtg ccc atg gaa gac 48
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp
1 5 10 15
ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg ata gga att ctg gtg ctc 96
Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu
20 25 30
ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg att atc ttc acc atc aag 144
Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys
35 40 45
gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt 192
Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys
50 55 60
cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag 240
Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys
65 70 75
ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg 288

Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val
80 85 90 95

gag aga tca cta cat taa accataag
Glu Arg Ser Leu His
100

314

<210> 23
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
1 5 10 15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
20 25 30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
35 40 45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
50 55 60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
65 70 75 80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Glu
85 90 95

Arg Ser Leu His
100

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu
1 5 10

<210> 25
<211> 1389
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

<400> 25
atgaaagtgt tgagtctgtt gtacctgttg acagccattc ctggtatcct gtctgatgta 60

cagcttcagg agtcaggacc tggcctcgtg aaaccttctc agtctctgtc tctcacctgc 120
tctgtcactg gctactccat caccagtggg tattactgga actggatccg gcagtttcca 180
ggaaacaaac tggaatggat gggctacata agctacgacg gtagcaataa ctacaaccca 240
tctctcaaaa atcgaatctc catcactcgt gacacatcta agaaccagtt tttcctgaag 300
ttgaattctg tgactactga ggacacagct acatattact gtgcaattct gggacgcggc 360
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 420
ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 480
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540
ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaa 660
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 720
tgcccacgtg gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca 780
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgctg ggtggtggac 840
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 960
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1080
ccacagggtg acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
ggtaaatga 1389

<210> 26

<211> 462

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 26

Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Ile Leu Gly Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 165 170 175
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 180 185 190
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 195 200 205
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 210 215 220
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 225 230 235 240
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 27

<211> 717

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

<400> 27

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacattgtgc tgacacagtc tctgtcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	120
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctagct atagttat'at gactgggtac	180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct	240
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat	300

cctgtggagg aggaggatac tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 360
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcacccctga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgctag 717

<210> 28
<211> 238
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 28

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 29
<211> 50
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 29
aaagcgccg cgcgcacc atgaaagtgt tgagtctgtt gtacctgttg 50

<210> 30
<211> 39
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 30
ctagtctaga tgaggagact gtgagagtgg tgccttggc 39

<210> 31
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 31
gtctctcag cctccacca gggcccatcg gtc 33

<210> 32
<211> 37
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 32
tgatcatcat ttacccggag acagggagag gctcttc 37

<210> 33
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 33
aaagcgccg ccgcccacc atggagacag acacactcct gc 42

<210> 34
<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 34
ctagtctaga cgttttattt ccagcttggt cccccctccg 40

<210> 35
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 35
aaataaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt ccc 43

<210> 36
<211> 39
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована праймерна послідовність

<400> 36
tgatcactag cactctcccc tgttgaagct ctttgtgac 39

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg
1 5 10 15

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601