

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038654**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890796

(22) Дата подачи заявки
2016.09.23

(54) НОВОЕ АНТИТЕЛО К МЕЗОТЕЛИНУ И СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО КОМПОЗИЦИЯ

(31) 10-2015-0135755

(32) 2015.09.24

(33) KR

(43) 2018.10.31

(86) PCT/KR2016/010604

(87) WO 2017/052241 2017.03.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**МОГАМ ИНСТИТЮТ ФОР
БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ; ГРИН
КРОСС КОРПОРЕЙШН (KR)**

(56) WO-A1-2009045957

KR-A-1020100097660

KR-A-1020140014116

Zhang et al., 'New high affinity monoclonal antibodies recognize non-overlapping epitopes on mesothelin for monitoring and treating mesothelioma' Scientific Reports, Vol.5, 09928, internal pages 1-14 (21 May 2015) See the whole document.

US-A1-20060204506

(72) Изобретатель:

**Ким Тон-Сик, Сон Ын Чон, Ли
Миджун, Ли Ын-Хи, О Миюн, Пак Чэ
Чан, Ким Кису, Ким Сучон, Лим Хён-
Квон, Ли Кюхён, Вон Чонхва, Цой
Суню, Пак Юн Соуб (KR)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение имеет отношение к антителу, специфически связывающемуся с мезотелином (MSLN), нуклеиновой кислоте, кодирующей данное антитело, вектору и клетке-хозяину, содержащей данную нуклеиновую кислоту, способу получения антитела и фармацевтической композиции для лечения рака или опухоли, включающей антитело в качестве активного ингредиента. Антитело, специфически связывающееся с мезотелином, согласно настоящему изобретению обладает высокой аффинностью и специфичностью к антигену, в результате этого стало возможным создание антитела, пригодного для эффективного использования при лечении или диагностике раковых или опухолевых заболеваний.

038654 B1

038654 B1

Область техники

Настоящее изобретение имеет отношение к антителу, специфически связывающемуся с мезотелином (MSLN), нуклеиновой кислоте, кодирующей данное антитело, вектору и клетке-хозяину, содержащей данную нуклеиновую кислоту, способу получения антитела и фармацевтической композиции для лечения рака или опухоли, включающей антитело в качестве активного ингредиента.

Уровень техники

Антитело является высокоэффективным средством для лечения различных видов рака или опухолей, включая солидные опухоли. Например, герцептин успешно используется при лечении рака молочной железы, а авастин успешно используется при лечении рака толстой кишки. Суть способа лечения рака или опухоли с помощью антитела заключается в создании антитела к белку на поверхности мембраны, который преимущественно экспрессируется (сверхэкспрессируется) на опухолевых клетках.

Мезотелин (MSLN) представляет собой гликопротеин в виде полипептида-предшественника 69 - 71kDa и экспрессируется в качестве предшествующей формы гликофосфатидилинозитол (GPI)-связанного белка на клеточной поверхности. Предшественник отделяется от фуринового сайта (RPRFRR) в предшественнике и образует 32kDa мегакариоцит-потенцирующий фактор (MPF), который является N-концевым полипептидом, высвобождаемым из клетки, имеющей GPI-связанный мембранный белок мезотелин, который является C-концевым полипептидом в 40kDa (Hassan R. et al., *CM. Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937-3942, 2004; Chang, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(1): 136-40, 1996).

Мезотелин был назван мегакариоцит-потенцирующим фактором (MPF), поскольку он был выделен из линии клеток поджелудочной железы человека HPC-Y5, при этом было установлено, что он обладает мегакариоцит-потенцирующей активностью (Yamaguchi N. et al., *J. Biol. Chem.* 269:805-808, 1994).

Функция мезотелина до сих пор еще четко не установлена. Более того, летальных репродуктивных, гематологических нарушений или анатомических аномалий не наблюдается у мышей с отсутствием экспрессии гена мезотелина (Berg, T.K. et al., *Mol Cell. Biol.* 20(8):2902-2906, 2000).

Мезотелин представляет собой гликопротеин, присутствующий на клеточной поверхности мезотелиальной выстилки перитонеальной, плевральной и перикардиальной вторичных полостей. Мезотелин преимущественно экспрессируется (сверхэкспрессируется) в раковых/опухолевых клетках злокачественной мезотелиомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака легкого и рака эндометрия. Напротив, его экспрессия в нормальной клетке, например мезотелиальной клетке, является незначительной, что делает его идеальной мишенью для лечения опухоли (Argani, P. et al., *CM. Cancer Res.*, 7(12):3862-8, 2001; Hassan, R., et al., *CM. Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937, 2004).

Кроме того, мезотелин специфически реагирует (взаимодействует) с CA125 (MUC-16), который является муциноподобным гликопротеином, присутствующим на поверхности опухолевой клетки и верифицированным в качестве антигена рака яичника. Говоря конкретнее, установлено, что связывание CA125 с мембраносвязанным мезотелином может опосредовать гетеротипическую клеточную адгезию и метастазирование, причем CA125 и мезотелин коэкспрессируются в прогрессирующей аденокарциноме яичника (Rump, A. et al., *J. Biol. Chem.*, 279(10):9190-8, 2004). Экспрессия мезотелина в эндотелии перитонеальной полости преимущественно связана с образованием метастазов рака яичника, а связывание мезотелин-CA125 способствует перитонеальному метастазированию опухоли яичника (Gubbels, J.A. et al., *Mol. Cancer*, 5(1):50, 2006).

В последние годы была разработана терапия направленного действия на основе антител, нацеленная на рак легкого, рак яичника и рак поджелудочной железы, которые экспрессируют мезотелин. Например, полученное путем иммунизации мыши mAb K1 было создано как первичное антитело против мембраносвязанного полипептида мезотелина (Chang, K., et al., *Int. J. Cancer*, 50(3):373, 1992). Однако вследствие низкой аффинности mAb K1 антитела и низкого уровня интернализации иммунотоксин, состоящий из mAb K1, связанного с укороченным типом химически модифицированного экзотоксина A *Pseudomonas*, не пригоден для клинических исследований (Hassan, R., et al., *J. Immunother.*, 23(4):473, 2000; Hassan, R., et al., *CM. Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937, 2004). Затем были созданы имеющие более высокую аффинность одноцепочечные антитела, содержащие SS1-(dsFv)-PE38, которые обладали способностью убивать опухолевые клетки *in vitro* (Hassan, R., et al., *CM. Cancer Res.*, 8(11):3520, 2002), и эффективные на моделях у грызунов опухолей человека, экспрессирующих мезотелин (Fan, D., et al., *Mol. Cancer Ther.*, 1(8):595, 2002). Из приведенных выше результатов понятно, что мезотелин представляет собой мишень, подходящую для иммунотерапии многих видов рака. Однако в клинических испытаниях было отмечено, что SS1-(dsFv)-PE38 обладает иммуногенностью, вследствие чего второе введение было прервано у большинства пациентов, при этом SS1-(dsFv)-PE38 обычно быстро удаляется из крови, и в связи с этим имеет место попытка индуцировать пегилирование SS1-(dsFv)-PE38 в форму гибридного белка, тем самым увеличивая персистенцию антитела *in vivo* (Filpula, D., et al., *Bioconjugate Chem.*, 18(3):773, 2007).

Клиническое испытание терапии рака иммунотоксином, имея грызуна с ксенотрансплантантом в качестве опухолевой модели, часто ограничивается отсутствием перекрестной реактивности между лечебным антителом и его гомологом от грызуна. Кроме того, нейтрализующее антимышь Fv антитело, сформировавшееся у пациента, обработанного антителом, полученным от грызуна, или химерным анти-

телом, может вызвать ограничивающую дозу токсичность или может снизить терапевтическую эффективность. Следовательно, для того, чтобы увеличить эффективность лечения рака, требуется целенаправленно воздействующее антитело, объединяющее в себе повышенную аффинность, пониженную скорость диссоциации и перекрестную реактивность у грызуна в отношении антигена мезотелина.

Помимо этого, в качестве дополнительного свойства нового антитела против мезотелина (MSLN) ему нужно сохранять аффинность в отношении мезотелина, экспрессированного на клеточной поверхности различных раковых или опухолевых клеток. Мезотелин является высоко изменчивым белком и подвергается гликозилированию, а также протеолизу после трансляции во многих местах (Hassan, R., et al., Clin Cancer Res., 10(12 Pt 1):3937, 2004). Судя по всему, вариант 1 транскрипта (Genbank NM_005823) представляет основные виды, обнаруженные в опухолевых клеточных линиях, протестированных на сегодняшний день, но поскольку было найдено три различных варианта сплайсинга, изменчивость распространяется на уровень транскрипции (Muminova, Z.E., et al., BMC Cancer, 4:19, 2004; Hellstrom, I, et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 15(5): 1014, 2006). Соответственно эффективное антиэндотелиновое антитело обеспечивает изменчивость в профиле гликозилирования, что приводит к экспрессии различных форм мезотелинов, однако требуется быть постоянно связанным с эпителиом мезотелина, экспрессированным на поверхностях раковой или опухолевой клетки, происходящей от разных пациентов, что не зависит от индивидуальной вариабельности.

Таким образом, настоящие изобретатели предприняли усилие для получения нового антитела, специфически связывающегося с MSLN, и в результате изобрели новое антитело, обладающее высокой аффинностью в отношении MSLN, сверхэкспрессированного на раковых клетках, и установили возможность применения данного антитела согласно настоящему изобретению в качестве эффективного противоопухолевого лекарственного средства, и тем самым завершили настоящее изобретение.

Раскрытие изобретения

Техническая проблема.

Целью настоящего изобретения является предоставление нового антитела, специфически связывающегося с мезотелином (MSLN), нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, вектора и клетки-хозяина, содержащей данную нуклеиновую кислоту, способа получения вышеуказанного и фармацевтической композиции для лечения рака или опухоли, включающей антитело в качестве активного ингредиента.

Другая цель настоящего изобретения заключается в предоставлении нового антитела, специфически связывающегося с мезотелином (MSLN).

Техническое решение.

Для достижения вышеупомянутых целей настоящее изобретение предоставляет мезотелин-специфическое антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 15, 21, 27 или 59; CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 16, 22, 28, 60, 65, 71, 75, 80, 84, 121, 122, 123 или 125; CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 17, 23, 29, 61, 66, 72, 76, 81, 85, 124 или 126.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет мезотелин-специфическое антитело, содержащее: вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, 18, 24, 30, 62, 67, 70, 77, 86 или 117; CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 19, 25, 63, 68, 73, 78 или 82; CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 20, 26, 64, 69, 74, 79, 83, 87, 118, 119 или 120.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет мезотелин-специфическое антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 112, 113, 114, 115 или 116, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 47, 52, 54, 56, 58, 109, 110 или 111.

Помимо этого, настоящее изобретение предоставляет нуклеиновую кислоту, кодирующую MSLN-специфическое антитело; и вектор, содержащий нуклеиновую кислоту; и клетку, в которую данный вектор вводится.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию для лечения рака или опухоли, включающую анти-MSLN антитело в качестве активного ингредиента.

Подписи к фигурам

Фиг. 1 иллюстрирует предсказанные структуры вариабельной области легкой цепи (VL) и вариабельной области тяжелой цепи (VH) клона MS502 из числа антимезотелин (MSLN) антител.

Фиг. 2 иллюстрирует относительное сравнение мутантов вариабельной области легкой цепи, принимая во внимание силу связывания.

Фиг. 3 иллюстрирует относительное сравнение мутантов вариабельной области тяжелой цепи, принимая во внимание силу связывания.

Фиг. 4 иллюстрирует вектор для экспрессии MSLN в клеточной линии.

Фиг. 5 иллюстрирует предшествующую форму и зрелую форму MSLN на SDS-PAGE.

Фиг. 6 иллюстрирует анализ количества MSLN-экспрессии клеточных линий и линий опухолевых

клеток, экспрессирующих MSLN.

Фиг. 7 иллюстрирует анализ селективного связывания в отношении клеточных линий, экспрессирующих MSLN, с использованием антитела против мезотелина (MSLN) настоящего изобретения.

Фиг. 8 иллюстрирует значения MFI, полученные при подтверждении того, связывается ли анти-MSLN антитело с клеточной мембраной злокачественной мезотелиомы (H226, H2052) и рака поджелудочной железы (AsPC-1) методом FACS.

Фиг. 9 иллюстрирует результаты, полученные при подтверждении того, связывается ли селективно анти-MSLN антитело настоящего изобретения с опухолевыми клетками, экспрессирующими MSLN.

Лучший вариант осуществления изобретения

Использованный в описании термин "мезотелин" или "MSLN" относится к любому из вариантов, изоформ и видовых гомологов человеческого MSLN, который естественным образом экспрессируется клетками.

Термин "человеческий мезотелин" относится к последовательности человеческого мезотелина, такой как полная аминокислотная последовательность человеческого мезотелина, имеющего учетный номер в Genbank NP_005814.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения были получены и выделены моноклональные антитела, которые структурно характеризуются как специфически связывающиеся с мезотелином, представленным SEQ ID NO: 127, например "клон MI323", "клон MI329", "клон MI403" и "клон MI407", и "клон MS501", "клон MS502", "клон MS503", "клон MS504", "клон MS505" и "клон MS506", и "клон C2G1", "клон C2G4", "клон C3C8", "клон 54", "клон 56", "клон 2-30", "клон 2-73" и "клон 2-78", и "клон 56-C2G4", "клон 2-30-C2G4", "клон 2-73-C2G4" и "клон 2-78-C2G4".

Аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи каждого антитела показаны в табл. 2, 5, 12 и 16 ниже. Как показано в табл. 1, 4, 11 и 15, анти-MSLN антитело может включать аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи или последовательность, имеющую гомологию с ними.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения отдельные клоны выделенных антител, т.е. "клон MI323", "клон MI329", "клон MI403", "клон MS502" и "клон C2G1", "клон C2G4", "клон C3C8", и "клон 56-C2G4", "клон 2-30-C2G4", "клон 2-73-C2G4" или "клон 2-78-C2G4" применительно к рекомбинантному человеческому MSLN, были отобраны с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) (данные не представлены), причем количественная оценка силы связывания проводилась с использованием биосенсора Bioscore T-200 (GE Healthcare, США) (пример 2-5, пример 3-11, пример 3-14). В результате, как показано в табл. 8, 14 и 18 ниже, все полученные клоны антител обладают аффинностью к мезотелину, даже несмотря на существование небольшой разницы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения для того, чтобы оценить связывается ли селективно анти-MSLN антитело, полученное из иммунной и искусственной библиотеки, с MSLN-экспрессирующей клеткой, в линии раковых клеток измеряется количество MSLN-экспрессии, а связывание антитела с каждой клеткой подтверждается с помощью FACS-анализа. В результате, как показано на фиг. 5, было подтверждено, что клеточные линии H28, MiaPaCa-2, BxPC-3, Саран-1 являются MSLN-отрицательными, а H226, H2452(H2052), AsPC-1 являются MSLN-положительными независимо от того, находится ли MSLN в форме предшественника 70kDa и в зрелой форме от 40 до 50kDa из каждой линии раковых клеток.

Кроме того, в результате проведения анализа селективного связывания анти-MSLN кандидатных антител в отношении MSLN-экспрессирующих клеточных линий (H226, H2452(H2052), AsPC-1), (смотри фиг. 8 и табл. 19), показано, что все MI323, MI329, MI403, MS502 кандидатные антитела обладают значительной силой связывания в отношении MSLN клеточных линий мезотелиомы и рака поджелудочной железы, даже несмотря на то, что существует небольшое различие в степени связывания. В частности, MI323 кандидатное антитело демонстрирует отличное связывание.

В свою очередь, оценка селективного связывания MI323 кандидатного антитела, обладающего отличным связыванием в отношении MSLN, MS502 кандидатного антитела, имеющего отличающееся значение Bioscore $K_D(K_{off}/K_{on})$, и кандидатного антитела 2-78-C2G4 с мутацией вариабельной области тяжелой цепи, полученного из MS502 кандидатного антитела, с MSLN-экспрессирующими опухолевыми клетками, была проведена в MiaPaCa-MSLN #2 клетке, которая сверхэкспрессирует MSLN, и клетке MiaPaCa-2, которая не сверхэкспрессирует MSLN, как показано на фиг. 9. Было установлено, что MI323, MS502 и 2-78-C2G4 кандидатные антитела демонстрируют отличное связывание в MiaPaCa-MSLN #2 клетке, которая сверхэкспрессирует MSLN по сравнению с MiaPaCa-2.

Следовательно, настоящее изобретение имеет отношение к антителу, специфически связывающемуся с мезотелином (MSLN), предпочтительно антителу, специфически связывающемуся с мезотелином, представленным SEQ ID NO: 127.

Антитело, специфически связывающееся с мезотелином согласно настоящему изобретению, характеризуется тем, что оно содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 15, 21, 27 или 59; CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 16, 22, 28, 60, 65, 71, 75, 80, 84,

121, 122, 123 или 125; CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 17, 23, 29, 61, 66, 72, 76, 81, 85, 124 или 126.

Антитело, специфически связывающееся с мезотелином согласно настоящему изобретению, характеризуется тем, что оно содержит переменную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, 18, 24, 30, 62, 67, 70, 77, 86 или 117; CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 19, 25, 63, 68, 73, 78 или 82; CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 20, 26, 64, 69, 74, 79, 83, 87, 118, 119 или 120.

В настоящем изобретении антитело, специфически связывающееся с мезотелином, может содержать переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% гомологию, предпочтительно по меньшей мере 90% гомологию и более предпочтительно 100% гомологию с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 112, 113, 114, 115 или 116, и антитело может содержать переменную область легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% гомологию, предпочтительно по меньшей мере 90% гомологию и более предпочтительно 100% гомологию с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 47, 52, 54, 56, 58, 109, 110 или 111.

В настоящем изобретении антитело, специфически связывающееся с мезотелином, характеризуется тем, что оно содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 112, 113, 114, 115 или 116, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 47, 52, 54, 56, 58, 109, 110 или 111, при этом антитело может быть человеческим моноклональным антителом, но без ограничения.

Аминокислотная последовательность антитела может быть заменена посредством консервативной замены. "Консервативная замена" имеет отношение к модификации полипептида, включая замену по меньшей мере одной аминокислоты аминокислотой, имеющей сходные биохимические свойства с соответствующим полипептидом без потери его биологической или биохимической функции. "Консервативная аминокислотная замена" имеет отношение к замене, при которой остаток аминокислоты заменяется остатком аминокислоты, имеющим сходные боковые цепи. Классы аминокислотных остатков, имеющие сходные боковые цепи, определены в данной области техники. Эти классы включают аминокислоты, имеющие основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), аминокислоты, имеющие кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), аминокислоты, имеющие незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), аминокислоты, имеющие неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), аминокислоты, имеющие бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин), и аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Предполагается, что антитело настоящего изобретения способно по-прежнему сохранять активность, имея консервативную аминокислотную замену.

Термин "значительная степень гомологии" означает, что когда два вида нуклеиновых кислот или два вида полипептидов или их обозначенные последовательности оптимально выравниваются и сравниваются, тогда нуклеиновые кислоты и полипептиды, имеющие соответствующие вставки или делеции нуклеотидов или аминокислот, обладают по меньшей мере 80% идентичностью с нуклеотидом или аминокислотой, как правило, обладают идентичностью по меньшей мере около 85%, предпочтительно около 90, 91, 92, 93, 94 или 95% и более предпочтительно по меньшей мере около 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 или 99,5% с нуклеотидом или аминокислотой. Альтернативно, в том случае, когда фрагмент гибридизируется с его комплементарной нитью при селективных условиях гибридизации, существует значительная степень гомологии с нуклеиновой кислотой. Настоящее изобретение включает нуклеиновокислотную последовательность и полипептидную последовательность, имеющую значительную степень гомологии с описанной выше специфической нуклеиновокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью.

В антителе согласно настоящему изобретению, например, последовательности CDR1, 2 и 3 тяжелой цепи (V_H) и последовательности CDR1, 2 и 3 легкой цепи (V_L), показанные в табл. 2, 5, 12 и 16, могут быть образованы путем смешивания структурно сходных последовательностей тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L), для того, чтобы расположиться в CDR1, 2 и 3 пар тяжелая цепь (V_H)/легкая цепь (V_L).

Использованный в описании термин "антитело" или "композиция антител" имеет отношение к препарату молекул антитела, имеющему одномолекулярный состав. В данном документе композиция моноклональных антител показывает одну специфичность связывания и аффинность к специфическому эпитопу. Соответственно термин "человеческое моноклональное антитело" имеет отношение к антителу, имеющему переменную область и константную область, происходящие из последовательности иммуноглобулина человека, и показывающему одну специфичность связывания. Человеческое антитело настоящего изобретения может включать аминокислотный остаток, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина человека (например, мутации, привнесенные путем *in vitro* случайного или сайт-специфического мутагенеза или путем соматической мутации *in vivo*).

"Антитело" при использовании в описании представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая иммунологически реагирует со специфическим антигеном, и означает молекулу белка, функционирующую как рецептор, который специфически распознает антиген, и может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (отдельный клон антител), целое антитело и фрагмент антитела. Более того, антитело может включать химерное антитело (например, гуманизированное мышшиное антитело) и двухвалентную или биспецифическую молекулу (например, биспецифическое антитело), диатело, триатело и тетраатело.

Полное антитело имеет структуру, содержащую две полноразмерных легких цепи и две полноразмерных тяжелых цепи, при этом каждая легкая цепь может быть связана с тяжелой цепью через дисульфидную связь. Полное антитело включает IgA, IgD, IgE, IgM, и IgG, причем IgG является подтипом и включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Фрагмент антитела означает фрагмент, сохраняющий функцию связывания с антигеном, и включает Fab, Fab', F(ab')₂, scFv и Fv и т.д.

Fab имеет структуру переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи и константную область легкой цепи и первую константную область (CH1 домен) тяжелой цепи, и имеет один антиген-связывающий участок. Fab' отличается от Fab тем, что Fab' имеет шарнирную область, включающую один или более остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи домена CH1. F(ab')₂ антитело образуется путем дисульфидной связи остатка цистеина в шарнирной области Fab'.

Fv (вариабельный фрагмент) означает минимальный фрагмент антитела, имеющий только вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. В двухцепочечном Fv(dsFv) вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи связаны дисульфидной связью. В одноцепочечном Fv(scFv) вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи в большинстве случаев связываются путем ковалентной связи с использованием пептидного линкера. Эти фрагменты антител можно получить, используя протеолитический фермент (например, Fab может быть получен путем рестрикции-разрезания целого антитела с использованием папаина, и F(ab')₂ фрагмент может быть получен путем разрезания пепсином), и можно создать с помощью технологии рекомбинантной ДНК (например, амплификации с помощью метода ПЦР (полимеразной цепной реакции), использующей ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела или его вариабельную область, и ДНК, кодирующую легкую цепь или вариабельную область, в качестве матрицы, и используя пару праймеров, и амплификацию с комбинацией ДНК, кодирующей пептидный линкер пары праймеров, который дает возможность обоим концам их связываться с тяжелой цепью или ее вариабельной областью и легкой цепью и ее вариабельной областью соответственно).

Имуноглобулин содержит тяжелые цепи и легкие цепи, при этом соответствующие тяжелые цепи и легкие цепи включают константную область и вариабельную область (эти области также известны под названием домены). Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи включают 3 мультидоступные участка, называемые гипервариабельными участками (или участком, определяющим комплементарность, именуемым в дальнейшем "CDR"), и четыре каркасные области. CDR предназначаются, главным образом, для связывания с эпитопом антигена. CDR соответствующих цепей последовательно называются CDR1, CDR2 и CDR3, начиная обычно с N-конца, и также идентифицируются по цепям, в которых располагаются специфические CDR.

Моноклональное антитело (антитело одного клона) при использовании в описании означает молекулу антитела одного молекулярного состава, полученную в одной и той же популяции антител, которое может иметь одну специфичность связывания и аффинность к специфическому эпитопу.

Моноклональное антитело (антитело одного клона) при использовании в описании является молекулой, производной от иммуноглобулина человека, и все аминокислотные последовательности, формирующие антитело, включая гипервариабельный участок, структурный участок, конфигурируются из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческое антитело, как правило, используется при лечении болезней человека, потому что является полезным в том отношении, что i) оно более благоприятно взаимодействует с иммунной системой человека, которая более эффективно разрушает клетки-мишени посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), ii) иммунная система человека не распознает антитело как чужеродный материал и iii) даже когда меньшее количество лекарственного средства вводится менее часто, время полужизни в системе кровообращения человека сходно с временем полужизни антитела природного происхождения.

Термины "клон MI323", "клон MI329", "клон MI403", и "клон MI407", и "клон MS501", "клон MS502", "клон MS503", "клон MS504", "клон MS505", и "клон MS506", и "клон C2G1", "клон C2G4", "клон C3C8", "клон 54", "клон 56", "клон 2-30", "клон 2-73", и "клон 2-78", и "клон 56-C2G4", "клон 2-30-C2G4", "клон 2-73-C2G4" и "клон 2-78-C2G4", которые являются антителами, специфически связывающимися с MSLN, использованным в данной работе, означают антитела, связывающиеся с MSLN и вызывающие ингибирование биологической активности MSLN, и могут использоваться вместо термина "анти-MSLN антитело".

В описании "клон MI323", "клон MI329", "клон MI403" и "клон MI407" являются антителами, полученными путем иммунизации мыши рекомбинантным человеческим MSLN, и клон MS501", "клон

MS502", "клон MS503", "клон MS504", "клон MS505" и "клон MS506" являются антителами, полученными с помощью фагового дисплея из scFV библиотеки, и "клон C2G1", "клон C2G4", "клон C3C8", "клон 54", "клон 56", "клон 2-30", "клон 2-73" и "клон 2-78" являются антителами, полученными путем введения мутации в "клон MS502", как показано в табл. 9, и "клон 56-C2G4", "клон 2-30-C2G4", "клон 2-73-C2G4" и "клон 2-78-C2G4" представляют собой антитела, полученные путем комбинации антител с внесенной мутацией.

K_D (равновесная константа диссоциации) антитела с MSLN может быть проиллюстрирована, как описано далее.

(1) клон MI323 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.8×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1.8×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 1.8×10^{-10} М или менее,

(2) клон MI329 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 3.5×10^{-9} М или менее, предпочтительно 3.5×10^{-10} М или менее и более предпочтительно 3.5×10^{-11} М или менее,

(3) клон MI403 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 4.5×10^{-8} М или менее, предпочтительно 4.5×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 4.5×10^{-10} М или менее,

(4) клон MS502 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 2.3×10^{-8} М или менее, предпочтительно 2.3×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 2.3×10^{-10} М или менее (см. табл. 8),

(5) клон C2G1 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 9.39×10^{-9} М или менее, предпочтительно 9.39×10^{-10} М или менее и более предпочтительно 9.39×10^{-11} М или менее,

(6) клон C2G4 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 4.32×10^{-9} М или менее, предпочтительно 4.32×10^{-10} М или менее и более предпочтительно 4.32×10^{-11} М или менее,

(7) клон C3C8 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.22×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1.22×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 1.22×10^{-10} М или менее (смотри табл.14),

(8) клон 56 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.25×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1.25×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 1.25×10^{-10} М или менее,

(9) клон 2-30 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.66×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1.66×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 1.66×10^{-10} М или менее,

(10) клон 2-78 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.63×10^{-9} М или менее, предпочтительно 1.63×10^{-10} М или менее и более предпочтительно 1.63×10^{-11} М или менее,

(11) клон 56-C2G4 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.63×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1.63×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 1.63×10^{-10} М или менее,

(12) клон 2-30-C2G4 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 2.34×10^{-8} М или менее, предпочтительно 2.34×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 2.34×10^{-10} М или менее,

(13) клон 2-73-C2G4 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 1.65×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1.65×10^{-9} М или менее и более предпочтительно 1.65×10^{-10} М или менее, и

(14) клон 2-78-C2G4 может иметь равновесную константу диссоциации (K_D) 3.72×10^{-9} М или менее, предпочтительно 3.72×10^{-10} М или менее и более предпочтительно 3.72×10^{-11} М или менее (смотри табл. 18).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения идентифицированы мышинные гены варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, полученные из иммунной библиотеки, связывающейся с человеческим MSLN, ген варибельной области тяжелой цепи связывается с геном константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина типа 1 (константная область тяжелой цепи IgG1), и ген варибельной области легкой цепи связывается с геном константной области каппа-легкой цепи человека. Эти гены вставляются в векторы экспрессии, соответственно предназначенные для продуцирования векторов в клетках животных, далее следует трансфекция в Expi293F™ клеточные линии и культивирование с целью выработки антител, затем полученные антитела очищают с помощью хроматографии на основе белка А для получения нужного антитела (пример 1-3).

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения идентифицированы гены варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, полученные из искусственной библиотеки scFV, связывающейся с человеческим MSLN, ген варибельной области тяжелой цепи связывается с геном константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина типа 1 (константная область тяжелой цепи IgG1), и ген варибельной области легкой цепи связывается с константной областью каппа-легкой цепи человека, и эти гены вставляются в векторы экспрессии, соответственно предназначенные для продуцирования векторов в клетках животных, далее следует трансфекция в Expi293F™ клеточные линии и культивирование с целью выработки антител, затем полученные антитела очищают с помощью хроматографии на основе белка А для получения нужного антитела (примеры 2-4, 3-10, 3-12 и 3-13).

Вследствие этого в другом аспекте настоящее изобретение предоставляет нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Используемая здесь нуклеиновая кислота может присутствовать в клетке, точном лизате или также может присутствовать в частично очищенной форме или в основном очищенной форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "является в основном чистой" в том случае,

когда она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих веществ, например другой нуклеиновой кислоты или белка, с помощью стандартных методов, включающих обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области техники. Нуклеиновая кислота настоящего изобретения может быть, например, ДНК или РНК, и может включать интронную последовательность или может не включать интронную последовательность.

В следующем аспекте настоящее изобретение предоставляет вектор, содержащий нуклеиновую кислоту. Для экспрессии антитела или фрагментов антитела можно получить ДНК, кодирующую легкую цепь и тяжелую цепь, имеющую часть полной длины или полную длину, с помощью стандартных методов молекулярной биологии (например, ПНР амплификации или клонирования кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует нужное антитело), при этом ДНК может быть "функционально связана" с регуляторными последовательностями транскрипции и трансляции, которые должны вставляться в экспрессирующий вектор.

Использованный в описании термин "функционально связанный" может означать, что ген антитела лигирован в вектор так, чтобы регуляторные последовательности транскрипции и трансляции в векторе осуществляли предусмотренную функцию по контролю за транскрипцией и трансляцией гена антитела. Экспрессирующий вектор и последовательность контроля экспрессии выбираются таким образом, чтобы имелась совместимость с клеткой-хозяином, используемой для экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела вставляются в отдельные векторы или оба гена вставляются в один и тот же вектор экспрессии. Антитело вставляется в вектор экспрессии с помощью стандартного метода (например, лигирования фрагмента гена антитела и комплементарного сайта рестрикционного фермента на векторе или в том случае, когда сайт рестрикционного фермента совсем не присутствует, лигирования по "тупым" концам). В некоторых случаях рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор так, что сигнальный пептид связывается с аминоконцом генов цепи антитела в соответствии с рамкой. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологичным сигнальным пептидом (т.е. сигнальным пептидом, полученным из белков, за исключением иммуноглобулина). В дополнение к этому рекомбинантный экспрессирующий вектор имеет регуляторную последовательность, которая контролирует экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. "Регуляторная последовательность" может включать промотор, энхансер и другой элемент, контролирующей экспрессию (например, сигнал полиаденилирования), контролирующей транскрипцию или трансляцию гена цепи антитела. Специалистам в данной области техники понятно, что конструкция вектора экспрессии может отличаться в результате изменения регуляторных последовательностей в соответствии с такими факторами как выбор клетки-хозяина, которая подвергается трансформации, уровень экспрессии белка и т.д.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предоставляет клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. Нуклеиновая кислота или вектор трансфицируется в клетку-хозяина. Для "трансфекции" с целью введения экзогенной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в прокариотическую клетку-хозяина или эукариотическую клетку-хозяина могут использоваться многие разновидности общепринятых методов, такие как электрофорез, осаждение фосфатом кальция, DEAE-декстран трансфекция, липофекция и т.д. Антитело согласно настоящему изобретению может экспрессироваться в эукариотической клетке, предпочтительно в клетке-хозяине млекопитающего, принимая во внимание возможность применения в клетке млекопитающего. Клетка-хозяин млекопитающего, подходящая для экспрессии антитела, может включать клетку яичника китайского хомячка (CHO) (например, включая dhfr-CHO клетку, используемую вместе с DHFR селективным маркером), NSO миеломную клетку, COS клетку или SP2 клетку и т.д., в качестве примеров.

В следующем аспекте настоящее изобретение предоставляет способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина с целью экспрессии антитела. Когда рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий ген антитела, вводится в клетку-хозяина млекопитающего, антитело может продуцироваться путем культивирования клетки-хозяина в течение достаточного периода времени, так что антитело экспрессируется в клетке-хозяине, или более предпочтительно в течение достаточного периода времени так, что антитело секретируется в культуральную среду, в которой клетка-хозяин культивируется.

В некоторых случаях экспрессированное антитело может быть выделено из клетки-хозяина и очищено для обеспечения однородности. Выделение или очистка антитела может осуществляться с помощью метода разделения, метода очистки, обычно используемого для белка, например хроматографии. Хроматография может включать, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию или гидрофобную хроматографию, включая хроматографию на колонке с белком А и колонке с белком G. В дополнение к хроматографии антитело может быть выделено и очищено путем дополнительного использования фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, диализа и т.д.

В следующем аспекте настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию для лечения рака или опухоли, включающую антитело в качестве активного ингредиента.

Термин "рак" или "опухоль" в большинстве случаев относится или описывает физиологическое состояние млекопитающих, характеризующееся неконтролируемым клеточным ростом/пролиферацией. Примеры рака включают карциному, лимфому (например, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), бластому, саркому и лейкемию, но не ограничиваются этим. Более конкретные примеры рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, перитонеальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярный рак, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, лейкоз и другие лимфопролиферативные заболевания и различные типы рака головы и шеи. Рак в настоящем изобретении предпочтительно является мезотелиноположительным раком, и его выбирают из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака яичника, рака легкого, рака желудка, рака эндометрия и мезотелиомы.

Настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, включающую терапевтически эффективное количество анти-MSLN антитела и фармацевтически приемлемый носитель. "Фармацевтически приемлемый носитель" - это вещество, которое может быть добавлено к активному ингредиенту с целью создания состава или стабилизации препарата, при этом оно не оказывает значительных неблагоприятных токсических воздействий на пациентов.

"Носитель" имеет отношение к носителю или разбавителю, который не ингибирует биологическую активность и свойства введенного соединения при отсутствии стимулирования пациентов. Фармацевтически приемлемый носитель в композиции, представляющей собой жидкий раствор, является стерилизованным и подходящим для живого организма. В качестве носителя может использоваться физиологический раствор, стерильная вода, раствор Рингера, забуференный физиологический раствор, инъекционный раствор альбумина, раствор декстрозы, раствор мальтодекстрина, глицерин, этанол или по меньшей мере один компонент из этого может использоваться для смешивания с другими общепринятыми добавками, такими как антиоксидант, буфер, бактериостатическое средство и т.д., которые могут быть добавлены при необходимости. Помимо этого композиция может быть приготовлена в виде составов для инъекций, таких как водный раствор, суспензия, эмульсия и т.д., в виде пилюли, капсулы, гранулы или таблетки в результате дополнительного добавления разбавителя, диспергирующего вещества, поверхностно-активного вещества, связывающего вещества и смазывающего вещества. Другие носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W. Martin). Композиция может содержать терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного анти-MSLN антитела.

Фармацевтически приемлемый носитель включает стерильный водный раствор или дисперсию и стерильный порошок для приготовления стерильного инъекционного раствора или дисперсии для немедленного применения. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. Композиция предпочтительно создается для парентерального введения. Композиция может быть создана в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или других упорядоченных структур, подходящих для высокой концентрации лекарственного средства. Носителем может быть, например, растворитель или дисперсионная среда, содержащая воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.д.) и их подходящие смеси. В некоторых случаях композиция может включать изотоническое вещество, например сахар, многоатомные спирты, такие как маннитол, сорбитол, или хлорид натрия. Стерильные инъекционные растворы можно получить внесением необходимого количества активного соединения в подходящий растворитель с одним из видов вышеописанных компонентов или их комбинацией с последующей стерильной микрофильтрацией в случае необходимости. В общем, дисперсию получают введением активного соединения в стерильный разбавитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые компоненты из числа описанных выше компонентов. Стерильный порошок для приготовления стерильного инъекционного раствора получают путем вакуумной сушки и сублимационной сушки (лиофилизации) порошка активного ингредиента и любого требуемого дополнительного порошкообразного компонента из ранее стерильно-профильтрованного раствора.

Фармацевтическая композиция может быть введена перорально или парентерально в дозировках и с частотой, которая может варьировать в зависимости от тяжести заболевания пациентов. Композиция может быть введена пациенту в виде болюсного (струйного) вливания или путем непрерывного вливания по необходимости. Например, болюсное введение антитела настоящего изобретения, которое представлено в виде Fab фрагмента, может составлять количество от 0,0025 до 100 мг/кг веса тела, от 0,025 до 0,25 мг/кг, от 0,010 до 0,10 мг/кг или от 0,10 до 0,50 мг/кг. Для непрерывного вливания антитело настоящего изобретения, которое представлено в виде Fab фрагмента, может составлять количество от 0,001 до 100 мг/кг кг/мин, от 0,0125 до 1,25 мг/кг/мин, от 0,010 до 0,75 мг/кг/мин, от 0,010 до 1,0 мг/кг/мин или от 0,10 до 0,50 мг/кг/мин в течение 1-24 ч, 1-12 ч, 2-12 ч, 6-12 ч, 2-8 ч или 1-2 ч. Когда вводится антитело настоящего изобретения, которое представлено как антитело полной длины (имеющее полную константную область), введенное количество может составлять примерно от 1 до 10 мг/кг веса тела, от 2 до 8 мг/кг или от 5 до 6 мг/кг. Антитело полной длины обычно вводится с помощью инъекции, которая про-

должается от 30 до 35 мин. Частота введения зависит от тяжести состояния. Частота может составлять от трех раз в неделю до одного раза в неделю или в две недели.

Кроме того, композиция может вводиться пациенту с помощью подкожной инъекции. Например, введение анти-MSLN антитела пациенту в количестве от 10 до 100 мг может происходить еженедельно, два раза в неделю или ежемесячно с помощью подкожной инъекции.

При использовании в описании "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для лечения болезней при приемлемом отношении польза/риск, применимом к медицинскому лечению, и количество комбинации анти-MSLN антитела. Точное количество может варьироваться в зависимости от целого ряда факторов, которые включают компоненты и физические характеристики терапевтической композиции, предполагаемую популяцию пациентов, обстоятельства, касающиеся отдельного пациента, и т.д., но не ограничиваются этим, и легко могут быть установлены специалистами в данной области. Когда все эти факторы учтены, важно вводить минимальное количество, достаточное для получения максимального эффекта при отсутствии побочного действия, и эта дозировка может быть легко определена специалистом в данной области.

Дозировка фармацевтической композиции настоящего изобретения не ограничивается особым образом, но изменяется в соответствии с различными факторами, включая состояние здоровья, вес, тяжесть заболевания пациента и тип лекарственного средства, способ введения и время введения. Композиция может быть введена способами, которые обычно используются для млекопитающих, включая крысу, мышь, крупный рогатый скот, человека и т.д., например перорально, ректально, внутривенно, подкожно, внутриматочно или интрацереброваскулярно в виде однократной дозы или нескольких доз в день.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Однако следующие далее примеры предоставляются только для пояснения настоящего изобретения, причем для специалистов в данной области техники будет очевидно, что эти примеры не следует истолковывать как ограничивающие границы объема настоящего изобретения.

Пример 1. Способ получения анти-MSLN антитела из иммунной библиотеки.

Способ предназначен для получения противоракового терапевтического средства на основе антитела к мезотелину (MSLN), сверхэкспрессированного на поверхности раковой клетки.

1-1. Выбор анти-MSLN антитела.

Мышь иммунизировали рекомбинантным человеческим MSLN, затем для получения В лимфоцитов извлекали селезенку. Общую РНК выделяли из В-лимфоцитов, и синтезировали кДНК. Различные гены антител мыши были клонированы из синтезированной кДНК при помощи полимеразной цепной реакции (PCR) и вставлены в фагмиду pComb3X для получения библиотеки антител, представляющих фрагменты антител с различными последовательностями. Для того, чтобы в библиотеке антител обнаружить антитело, специфически связывающееся с человеческим MSLN, магнитные гранулы с фиксированным на них MSLN смешивали с библиотекой антител, а клоны, связанные с антигеном-мишенью, выделяли и культивировали. Затем клоны (MI323, MI329, MI403 и MI407), специфически связанные с антигеном-мишенью (человеческий MSLN), индивидуально идентифицировали при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и устанавливали последовательности генов антител и их аминокислотные последовательности при помощи анализа нуклеотидных последовательностей.

В результате, как показано в табл. 1, клоны, специфически связанные с человеческим MSLN, были отобраны, и установлены их аминокислотные последовательности.

Табл. 2 показывает аминокислотные последовательности CDR клонов антител из табл. 1, исходя из нумерации по Kabat.

Таблица 1

| Клон | Вариантная область | Аминокислотная последовательность | SEQ ID NO: |
|-------|--------------------|--|------------|
| MI323 | тяжелая цепь | EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYSFTSYFIQWVKQR PGQGLEWIGWIFPGSGNTKYNEMFKGKATLAADTSSSTA YMQLSLSTSEDSAVYFCARSGGYQYYPDYWGQGSTVTV SS | 1 |
| | легкая цепь | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGQSPKLLIYSASYRYPGVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQ AEDLALYYCQHYSTPWTFGGGTKLEIKR | 2 |
| MI329 | тяжелая цепь | EVMLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTSSYAMSWVRR TPEKRLIEWVATINSDGSYTFYPSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNLSRSEDAMYYCARWGENWYFDVWGAGTTVTV SS | 3 |
| | легкая цепь | DVVMQTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSVGPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDLGIYFCSQSTHFPRTFGGATKLELKR | 4 |
| MI403 | тяжелая цепь | EVQVVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFASFSSYDMSWVR QTPEKRLIEWVAYISSGGGTYYPDTVKGRFTISRDNKNT LYLQMNLSKSEDAMYYCARQGTAVKNYWFYFDVWGA GTSVTVSS | 5 |
| | легкая цепь | DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSYVHWY QQRPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHP VEEEDTGTYCQHSWEIPFTFGSGTKLEIKR | 6 |
| MI407 | тяжелая цепь | EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFPSNYDMSWVRQ TPEKRLIEWVAYISSGGGNTYYPDTVKGRFTISRDNKNTL YLQMSLSKSEDALYFCVRQGTSVESYWFYFDVWGAGTT VTVSS | 7 |
| | легкая цепь | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSYVHWYQ QKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPV EEDDTATYYCQHSWEIPFTFGSGTELEIKR | 8 |

Таблица 2

| Клон | Вариантная область | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|-------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| MI323 | тяжелая цепь | SYFIQ (SEQ ID NO: 9) | WIFPGSGNTKYNEMFKG (SEQ ID NO: 10) | SGGYQYYPDY (SEQ ID NO: 11) |
| | легкая цепь | KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 12) | SASYRYP (SEQ ID NO: 13) | QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 14) |
| MI329 | тяжелая цепь | SYAMS (SEQ ID NO: 15) | TINSDGSYTFYPSVKG (SEQ ID NO: 16) | WGENWYFDV (SEQ ID NO: 17) |
| | легкая цепь | RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 18) | KVSNRFS (SEQ ID NO: 19) | SQSTHFPR (SEQ ID NO: 20) |
| MI403 | тяжелая цепь | SYDMS (SEQ ID NO: 21) | YISSGGGTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 22) | QGTAVKNYWFYFDV (SEQ ID NO: 23) |
| | легкая цепь | RASQSVSTSSSYVH (SEQ ID NO: 24) | YASNLES (SEQ ID NO: 25) | QHSWEIPFT (SEQ ID NO: 26) |
| MI407 | тяжелая цепь | NYDMS (SEQ ID NO: 27) | YISSGGGNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 28) | QGTSVESYWFYFDV (SEQ ID NO: 29) |
| | легкая цепь | SVSTSSSYIH (SEQ ID NO: 30) | YASNLES (SEQ ID NO: 25) | QHSWEIPFT (SEQ ID NO: 26) |

1-2. Клонирование гена IgG MI323, MI329, MI403 и MI407 моноклональных антител.

Была выделена фагида pComb3X, содержащая гены, кодирующие вариабельные области тяжелой цепи MI323, MI329, MI403 и MI407 клонов антител, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР с использованием прямого праймера, содержащего NotI (табл. 3: SEQ ID NOs: 31-34), и обратного праймера, содержащего ApaI (табл. 3: SEQ ID NO: 35), с применением смеси Accupower Pfu PCR premix (Bio-ener). ПЦР проводили путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин и затем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов, и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были выделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем проводили реакцию разделенных генов с рестрикционными ферментами NotI, ApaI при 37°C в течение 12 ч или более, и гены, прореагировавшие с рестрикционными ферментами, снова были разделены в 1%-ном агарозном геле. Плазмидный вектор pClW, содержащий ген константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина типа 1 (константной области тяжелой цепи IgG1), также был вырезан с помощью того же самого метода, как описано выше, и отделен на агарозном геле. Отделенные MI323, MI329, MI403 и MI407 гены вариабельной области тяжелой цепи были вставлены в линейный pClW вектор, содержащий человеческую константную область тяжелой цепи, по сайтам NotI, ApaI с помощью T4 ДНК лигазы (кат. № M0203S, New England Bio-Labs (NEB)). Трансформацию бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene) проводили лигазной смесью, затем их высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 12 ч или более. Затем отбирали и культивировали отдельные колонии, выделяли плазмиды при помощи мини-набора для выделения плазмид (кат. № 27405, QIAGEN) и подтверждали путем секвенирования ДНК.

Была выделена pComb3X фагида, содержащая гены, кодирующие вариабельные области легкой цепи MI323, MI329, MI403 и MI407 клонов антител, которую использовали в качестве матрицы для ПНР вариабельных областей легкой цепи MI323, MI329, MI403 и MI407 клонов антител, при этом ПНР проводили с использованием прямого праймера, содержащего NotI (табл. 3: SEQ ID NO: 36, 38, 40, 42), и обратного праймера (табл. 3: SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43) при помощи Accupower Pfu PCR premix. Затем кон-

стантную область каппа-легкой цепи антитела человека подвергали ПНР с использованием прямого праймера (табл. 3: SEQ ID NO: 44) и обратного праймера, содержащего сайт HindIII (табл. 3: SEQ ID NO: 45). ПНР проводилась путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин, затем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были выделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем соответствующие переменные области легкой цепи и константные области легкой цепи смешивали и проводили ПЦР с перекрывающимися праймерами, так что происходило клонирование генов, экспрессирующих области легких цепей. ПЦР проводилась путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин, затем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были выделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем проводили реакцию разделенных генов с рестрикционными ферментами NotI, HindIII при 37°C в течение 12 ч или более, и гены, прореагировавшие с рестрикционными ферментами, снова были разделены на 1%-ном агарозном геле. Также была проведена рестрикция плазмидного вектора pcIW, как описано выше, и разделение (фрагментов) на агарозном геле. Отделенные гены областей легких цепей MI323, MI329, MI403 и MI407 были вставлены в линейный pcIW вектор по сайтам NotI, HindIII с помощью T4 DNA лигазы (кат. № M0203S, New England BioLabs (NEB)). Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene) и их высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 12 ч или более. Затем отбирали отдельные колонии и культивировали их, и плазмиды выделяли при помощи мининабора для выделения плазмид (кат. № 27405, QIAGEN) и подтверждали секвенированием ДНК.

Таблица 3

| Название | Последовательность нуклеотидов ДНК | SEQ ID NO: |
|-------------|---|------------|
| MI323VH-F | GCGGCCCGCCATGTAAGTGGGACTGAAGTATGTAATTCATAGTTT TTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCT T | 31 |
| MI329VH-F | GCGGCCCGCCATGTAAGTGGGACTGAAGTATGTAATTCATAGTTT TTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTGATGCTGGTGGAGTCT T | 32 |
| MI403VH-F | GCGGCCCGCCATGTAAGTGGGACTGAAGTATGTAATTCATAGTTT TTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTGCAGGTGGTGGAGTCT T | 33 |
| MI407VH-F | GCGGCCCGCCATGTAAGTGGGACTGAAGTATGTAATTCATAGTTT TTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTGAAGTGGTGGAGTCT T | 34 |
| VHApal-R | ACCGATGGGCCCCCTGGTGGGA | 35 |
| MI323VL-F | GCGGCCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATGCTGCTG CTGCTGTGGGTGTCAGGGACTGCGGGGACATTTGTGATGACCC AGTCTCACAAA | 36 |
| MI323VLCL-R | ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTATTTCAGTTTGGTCC CT | 37 |
| MI329VL-F | GCGGCCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATGCTGCTG CTGCTGTGGGTGTCAGGGACTGCGGGGACGTTGTGATGACCC AGACTCCACTC | 38 |
| MI329VLCL-R | ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTATTTCAGTTTGGTCC CCGA | 39 |
| MI403VL-F | GCGGCCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATGCTGCTG CTGCTGTGGGTGTCAGGGACTGCGGGGATATTGTGATGACCC AGTCTCCTGCT | 40 |
| MI403VLCL-R | ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTATTTCAGTTTGGTCC CCGA | 41 |
| MI407VL-F | GCGGCCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATGCTGCTG CTGCTGTGGGTGTCAGGGACTGCGGGGATATTGTGTTGACAC AGTCTCCTGCT | 42 |
| MI407VLCL-R | ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTATTTCAGTTTGGTCC CCG | 43 |
| Ck-F | ACCGTGGCCGCTCCTAGTGT | 44 |
| CkSHB-R | NNNNGGATCCAAGCTTACTAGCACTCCCC | 45 |

1-3. Получение и очистка IgG MI323, MI329, MI403 и MI407 клонов антител.

Для того, чтобы получить и очистить клоны MI323, MI329, MI403 и MI407 анти-MSLN антитела, полученные посредством иммунного ответа у мыши, клетки Expi293F™ инокулировали при концентрации 2.0×10^6 клеток/мл за день до трансфекции. После инкубации (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 24 ч добавили среду для экспрессии Expi293F™ (кат. № A1435101, Gibco), чтобы получить 30 мл культуры с концентрацией 2.5×10^6 клеток/мл (жизнеспособность=95%). 30 мкг ДНК (pcIW-анти-MSLN тяжелая цепь: 15 мкг, pcIW-анти-MSLN легкая цепь: 15 мкг) развели в среде OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco), так чтобы получился общий объем 1,5 мл, и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco) смешали с 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco), так что общий объем составил 1,5 мл, и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. После реакции в течение 5 мин 1,5 мл разведенной ДНК и 1,5 мл разведенного реагента ExpiFectamine™ 293 хорошо перемешивали друг с другом и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 20-30 мин. В Expi293F™ клетки добавили 3 мл смеси ДНК и реагента ExpiFectamine™ 293. После культивирования суспензии клеток

(37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 16 -18 ч сюда добавили 150 мкл ExpiFectamine™ 293 усиливающего агента 1 (кат. № A14524, Gibco) и 1,5 мл ExpiFectamine™ 293 усиливающего агента 2 (кат. № A14524, Gibco) и культивировали суспензию далее в течение 5 дней. После культивирования клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, и супернатант пропускали через фильтр 0,22 µm. MabSelect Xtra (кат. № 17-5269-02, GE Healthcare), который представляет собой аффинный носитель с протеином А (100 мкл), готовили для каждых 30 мл культуральной жидкости, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин для удаления исходного раствора и полученный продукт промывали 400 мкл буфера для связывания белка А (кат. № 21007, Pierce) 3 раза. Носитель с белком А добавляли для приготовления культуральной жидкости и проводили реакцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной жидкости и носителя помещали в спин-колонку с крышкой-защелкой Pierce (кат. № 69725, Thermo), и затем в колонке оставляли только носитель с помощью QIAvac 24 Plus (кат. № 19413, QIAGEN) вакуумного коллектора. Добавили 5 мл буфера для связывания белка А, чтобы промыть носитель, сюда же добавили 200 мкл элюирующего буфера для белка А (кат. № 21009, Pierce). Полученный материал ресуспензировали при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин и элюировали. Каждый элюат нейтрализовали добавлением 2.5 мкл 1.5M Tris-HCl (pH 9.0). Элюирование проводили от 4 до 6 раз, и каждую фракцию подвергали количественной оценке, используя Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Фракции, в которых обнаруживали белок, собирали и переводили в буфер PBS (фосфатно-буферный раствор) при помощи колонок Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 мл (кат. № 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка (SDS-PAGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, чтобы окончательно подтвердить количественное значение концентрации и состояние антитела, и антитело хранили при 4°C.

Пример 2. Способ получения анти-MSLN антитела из фаговой синтетической scFv библиотеки.

2-1. Селекция античеловек MSLN scFv антитела с использованием фагового дисплея.

Для первичного пэннинга проводили реакцию 1 мл 10¹³ или более стокового раствора библиотеки в твердофазной полистироловой пробирке (кат. № 444202, Nunc), покрытой MSLN при 37°C в течение 2 ч. В то же самое время 10 мкл XL1-Blue бактерий (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene) инокулировали с 10 мкл SB 10 мл/тетрациклина и выращивали до значения OD₆₀₀ от 0,8 до 1,0. Стоковый раствор библиотеки, полученный после реакции при 37°C в течение 2 ч, промывали 5 мл 0,05% Твин 20/PBS четыре раза, причем, начиная со второго пэннинга, число раз промывки 0,05% Твином 20/PBS увеличивалось в зависимости от числа раз пэннинга. Затем полученный материал культивировали с 1% BSA/0.1M Глицин pH 2.0 при комнатной температуре в течение 10 мин с целью выделения фагмиды. Очищенную фагмиду переносили в 50 мл пробирку и нейтрализовали 70 мкл 2M Tris. Было обработано 9 мл XL1-Blue бактерий (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), и 1 мл бактерий было обработано в промытой камере (washed tube). Бактерии инфицировали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем добавили к ним 10 мл SB, 20 мкл тетрациклина, 10 мкл карбенициллина, а затем культивировали суспензию клеток при 37°C и 220 об/мин в течение 1 ч. Затем бактерии обработали 1 мл VCS M13 хелперного фага (10¹¹ pfu) и культивировали суспензию при 37°C и при 220 об/мин в течение 1 ч, затем обработали 80 мл SB, 100 мкл канамицина и 100 мкл карбенициллина и культивировали при 37°C и при 220 об/мин в течение 12 ч или более. Бактерии, культивированные в течение более 12 ч, центрифугировали при 3500 об/мин и при 4°C в течение 10 мин, и супернатант перенесли в новую пробирку. В нее добавили 20 мл 20% PEG/15% NaCl, хорошо перемешали и дали возможность прореагировать на льду в течение 30 мин. Затем супернатант отбросили, а осадки собрали и ресуспендировали с 2 мл 1% BSA/PBS при 8000 об/мин и при 4°C в течение 30 мин, затем центрифугировали при 15000 об/мин и 4°C в течение 10 мин. В данном случае собранные осадки отбросили, 1 мл супернатанта (из 2 мл) хранили при -20°C, а остаток (1 мл) использовали в пэннинге следующего порядка.

2-2. Установление отдельных клонов в соответствии с ELISA.

Отдельные колонии синтетической scFv библиотеки фагового дисплея после финальной амплификации собирали и культивировали с 1,5 мл SB/карбенициллина до OD 600 от 0,8 до 1,0 при 37°C и при 220 об/мин, и затем культивировали с 1 mM IPTG при 30°C и при 200 об/мин в течение 12 ч или более. Материалы реакции центрифугировали при 5500 об/мин в течение 5 мин, супернатант добавили в ELISA планшеты, содержащие подложку MSLN антигена, и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем полученные материалы промывали PBST (1XPBS, 0.05% Твин 20) четыре раза, сюда добавили конъюгат HRP/Анти-hFab-HRP, разбавленный 1/5000 с использованием 1% BSA/1XPBS, дали прореагировать при комнатной температуре в течение 1 ч и промывали PBST (1XPBS, 0.05% Твин 20) 4 раза. Затем сюда добавили ТМВ раствор, дали прореагировать в течение от 5 до 10 мин и сюда добавили ТМВ стоп-раствор. Затем были измерены значения OD при длине волны 450 нм с использованием фотометра TECAN Sunrise, и клоны, имеющие высокое значение OD, были установлены как индивидуальные клоны.

В результате, как показано в табл. 4, были отобраны клоны, специфически связанные с челове-

ским MSLN, а затем были идентифицированы их аминокислотные последовательности.

Табл. 5 показывает аминокислотные последовательности CDR клонов антител из табл. 4, исходя из нумерации по Kabat.

Таблица 4

| Клон | Вариабельная область | Аминокислотная последовательность | SEQ ID NO: |
|---------|----------------------|---|------------|
| MS501 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSGIYPDSGSTYYADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNIYTFDYWGQGT LVTVSS | 46 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKLTVLG | 47 |
| MS502 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSGIYPPDSGSKYYADSVRGRFTVSRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMLSFDYWGQGT LVTVSS | 48 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKLTVLG | 49 |
| MS502-1 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSGIYPPDSGSKYYADSVRGRFTVSRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMLSFDYWGQGT LVTVSS | 48 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKLTVLG | 50 |
| MS503 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSSIYPDGGSTYYADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAFTFDYWGQGT LVTVSS | 51 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGTWDSSLNGYVFGGGTKLTVLG | 52 |
| MS504 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSSIYPNGSSKYYADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKLLTFDYWGQGT LVTVSS | 53 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGPPGQRTVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYDHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGL RSEDEADYYCGAWDDSLNAYVFGGGTKLTVLG | 54 |
| MS505 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAIYPDGSNKYYADSVKGRFTVSRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYTFDYWGQGT LVTSS | 55 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGRRVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYNSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKLTVLG | 56 |
| MS506 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSSIYPGSGSTYYADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYTFDYWGQGT LVTVSS | 57 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSSNIGSNVSWYQQ LPGTAPKLLIYDHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGP RSEDEADYYCGAWDSSLAYVFGGGTKLTVLG | 58 |

Таблица 5

| Клон | Вариабельная область | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|---------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| MS501 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIYPDSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 60) | NIYTFDY (SEQ ID NO: 61) |
| | легкая цепь | SGSSNIGSNVAVS (SEQ ID NO: 62) | YNNQRPS (SEQ ID NO: 63) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 64) |
| MS502 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDGSKYYADSVRG (SEQ ID NO: 65) | HMLSFY (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSNIGSNVAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |
| MS502-1 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDGSKYYADSVRG (SEQ ID NO: 65) | HMLSFY (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | ICSSNIGSNVAVS (SEQ ID NO: 70) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |
| MS503 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | SIYPDGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 71) | NAFTFDY (SEQ ID NO: 72) |
| | легкая цепь | SGSSNIGSNVAVS (SEQ ID NO: 62) | YNSHRPS (SEQ ID NO: 73) | GTWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 74) |
| MS504 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | SIYPNGSSKYYADSVKG (SEQ ID NO: 75) | NLLTFDY (SEQ ID NO: 76) |
| | легкая цепь | TGSSNIGSNVAVS (SEQ ID NO: 77) | YDHRPS (SEQ ID NO: 78) | GAWDDSLNAYV (SEQ ID NO: 79) |
| MS505 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | AIYPDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 80) | NAYTFDY (SEQ ID NO: 81) |
| | легкая цепь | SGSSNIGSNVAVS (SEQ ID NO: 62) | YNSQRPS (SEQ ID NO: 82) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 83) |
| MS506 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | SIYPGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 84) | NLYTFDY (SEQ ID NO: 85) |
| | легкая цепь | TGSSNIGSNVAVT (SEQ ID NO: 86) | YDHRPS (SEQ ID NO: 78) | GAWDSSLAYV (SEQ ID NO: 87) |

2-3. Клонирование гена IgG антимерозелинового антитела.

Была выделена рComb3X фагмида, содержащая гены, кодирующие переменные области легкой цепи полученных MS501, MS502, MS503, MS504, MS505 и MS506 клонов антител, и которую использовали в качестве матрицы для ПЦР переменных областей легкой цепи MS501, MS502, MS503, MS504, MS505 и MS506 клонов антител, при этом ПЦР проводили с использованием прямого праймера, содер-

жащего NotI (SEQ ID NO: 86), и обратного праймера (SEQ ID NO: 87) с использованием готовой смеси Accupower Pfu PCR premix. Далее, константную область каппа-легкой цепи антитела человека подвергли ПЦР с использованием прямого праймера (табл. 6: SEQ ID NO: 88) и обратного праймера (табл. 6: SEQ ID NO: 89). ПЦР проводили путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин и затем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем соответствующие вариабельные области легкой цепи и константные области легкой цепи смешивали и проводили ПЦР с перекрывающимися праймерами, так что происходило клонирование генов, экспрессирующих области легких цепей. ПЦР проводилась путем повтора экспозиций при 94°C в течение 10 мин, затем при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов, и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем проводили реакцию разделенных генов с рестрикционными ферментами NotI, HindIII при 37°C в течение 12 ч или более, и гены, прореагировавшие с рестрикционными ферментами, снова были разделены в 1%-ном агарозном геле. Также была проведена рестрикция плазмидного вектора pCIW тем же самым способом, как описано выше, и разделение (фрагментов) в агарозном геле. Выделенные гены областей легких цепей MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, MS506 были вставлены в линейный pCIW вектор по сайтам NotI, HindIII с помощью T4 ДНК лигазы (кат. № M0203S, New England BioLabs (NEB)). Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), которые высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 12 ч или более. Затем отбирали отдельные колонии и культивировали их, а плазмиды выделяли при помощи мининабора для выделения плазмид (кат. № 27405, QIAGEN) и подтверждали секвенированием ДНК.

Была выделена фагида pComb3X, содержащая гены, кодирующие вариабельные области тяжелой цепи MS501, MS502, MS503, MS504, MS505 и MS506 клона антител, и которую использовали в качестве матрицы для ПЦР с использованием прямого праймера, содержащего NotI (табл. 6: SEQ ID NO: 90), и обратного праймера, содержащего ApaI (табл. 6: SEQ ID NO: 91), с использованием готовой смеси Accupower Pfu PCR premix (Bioneer). ПЦР проводилась путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин, а затем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем проводили реакцию разделенных генов с рестрикционными ферментами NotI, ApaI при 37°C в течение 12 ч или более, и гены, вступившие в реакцию с рестрикционными ферментами, были вновь разделены в 1%-ном агарозном геле. Также была проведена рестрикция плазмидного вектора pCIW, содержащего ген константной области тяжелой цепи иммуноглобулина 1 типа человека (IgG1 константная область тяжелой цепи) с помощью того же самого метода, описанного выше, и он был отделен на агарозном геле. Выделенные гены MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, и MS506 вариабельных областей тяжелой цепи были вставлены в линейный pCIW вектор, содержащий человеческую константную область тяжелой цепи, по сайтам NotI, ApaI, с помощью T4 ДНК лигазы (кат. № M0203S, New England BioLabs (NEB)). Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), которые затем высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 12 ч или более. Затем отбирали отдельные клоны и культивировали их, и плазмиды выделяли при помощи мининабора для выделения плазмид (кат. № 27405, QIAGEN) и подтверждали секвенированием ДНК.

Таблица 6

| Название | Нуклеотидная последовательность | SEQ ID NO: |
|-------------------|--|------------|
| NotI-Leader- VL-F | NNNNGCGGCCGATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGA TGCTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACTTG CGGGCAGTCTGTGCTGACTCAGCCA | 88 |
| VL-R | GGGGTTGGCCTTGGGCTGGCCTAGGACCGTCAGCTTGG T | 89 |
| VL-CL-F | CAGCCCAAGGCCAACCCC | 90 |
| HindIII-VL-R | NNNNGGATCCAAGCTTACTAACATTCTGTAGGGGCCAC TGTC | 91 |
| HD-Heavy-F | GGTGTCCAGGCGGCCGATGTACTTGGGACTGAACCTA TGTATTCATAGTTTTCTCTAAATGGTGTCCAGAGTGA GGTGCAGCTGTTGGAGTCTG | 92 |
| HD-Heavy-R | GGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGCTC ACGGTGACCAGTGT | 93 |

2-4. Получение и очистка IgG MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, MS506 клонов антител.

Для того, чтобы получить и очистить MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, MS506 клоны антител, полученные из scFv библиотеки фагового дисплея, Expi293F™ клетки высевали при концентрации 2.5×10^6 клеток/мл за день до трансфекции. После инкубации (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 24 ч добавили среду для экспрессии Expi293™ (кат. № A1435101, Gibco), чтобы получить 30 мл культуры с

концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность=95%). 30 мкг ДНК (pcIw-MS502 переменная область тяжелой цепи: 15 мкг, pcIw-антимезотелин переменная область легкой цепи: 15 мкг) растворили в среде OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco), так что общий объем составил 1,5 мл, и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco) смешали с 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco), так что общий объем составил 1,5 мл, и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. После реакции в течение 5 мин 1,5 мл разведенной ДНК и 1,5 мл разведенного реагента ExpiFectamine™ 293 хорошо перемешивали друг с другом и давали прореагировать при комнатной температуре в течение 20-30 мин. В Expi293F™ клетки добавили 3 мл смеси ДНК и реагента ExpiFectamine™ 293. После культивирования суспензии (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 16-18 ч сюда добавили 150 мкл ExpiFectamine™ 293 усиливающего агента 1 (кат. № A14524, Gibco) и 1,5 мл ExpiFectamine™ 293 усиливающего агента 2 (кат. № A14524, Gibco) и культивировали суспензию далее в течение 5 дней. После культивирования клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, и супернатант пропускали через 0,22 μm фильтр. MabSelect Xtra (кат. № 17-5269-02, GE Healthcare), который представляет собой аффинный носитель с протеином А (100 мкл), готовили для каждых 30 мл культуральной жидкости, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин для удаления исходного раствора и полученный продукт промывали 400 мкл буфера для связывания белка А (кат. № 21007, Pierce) 3 раза. Носитель с белком А добавляли для приготовления культуральной жидкости и проводили реакцию при вращении при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной жидкости и носителя помещали в спин-колонку с крышкой-защелкой pierce (кат. № 69725, Thermo) и затем в колонке оставляли только носитель с помощью QIAvac 24 Plus (кат. № 19413, QIAGEN) вакуумного коллектора. Добавили 5 мл буфера для связывания белка А, чтобы промыть смолу, сюда же добавили 200 мкл элюирующего буфера для белка А (кат. № 21009, Pierce). Полученный материал ресуспензировали при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин и элюировали. Каждый элюат нейтрализовали добавлением 2,5 мкл 1.5M Tris-HCl (pH 9.0). Элюирование проводили от 4 до 6 раз, и каждую фракцию подвергали количественной оценке, используя Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Фракции, в которых обнаруживали белок, собирали и переводили в буфер PBS (фосфатно-буферный раствор) при помощи колонок Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 мл (кат. № 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка (SDS-PAGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, чтобы окончательно подтвердить количественное значение концентрации и состояние антитела, и антитело хранили при 4°C.

2-5. Количественное определение силы связывания анти-MSLN антитела с антигеном.

Силу связывания (аффинность) очищенных анти-MSLN антител, т.е. MI323, MI329, MI403, MS502 клонов антител, с рекомбинантным человеческим мезотелином (MSLN) количественно измеряли с помощью биосенсора Biacore T-200 (GE Healthcare, U.S.A.). MSLN (кат. № 3265-MS, R&D systems), выделенный из HEK293 клеток, фиксировали на CM5 чипе (GE Healthcare, США), так чтобы соответствовать 200 Rmax при использовании аминкарбоксильной реакции. Затем, клон C2G1 антитела, клон C2G4 антитела или клон C3C8 антитела, серийно разведенные HBS-EP буфером (10 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% поверхностно-активный P20) пропускали через ячейку при концентрации в диапазоне от 0.078 до 5нМ и скорости потока 30 мкл/мин для ассоциации 120 с и для диссоциации 1800 с. Диссоциацию антитела, связанного с MSLN, индуцировали промыванием 10 mM глицин-HCl pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с (табл. 7). Аффинность была получена как константы скорости движения (K_{on} и K_{off}) и равновесная константа диссоциации (KD) с помощью программного обеспечения Biacore T-200 (табл. 8).

Таблица 7

| | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| SPR | Biacore T200 |
| Чип | CM5 |
| Подвижный буфер | HBS-EP pH7.4 |
| Скорость потока | 30мкл/мин |
| Время ассоциации / диссоциации | 120 сек / 600 сек |
| IgG конц. | 0.078~5нМ, 1/2 серийное разведение |
| Восстановление | 10 mM Глицин-HCl pH1.5, 30 сек |

Таблица 8

| | K_{on} | K_{off} | KD |
|-------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| MI323 | 2.7×10^5 | 4.8×10^{-5} | 1.8×10^{-10} |
| MI329 | 1.4×10^6 | 5.1×10^{-5} | 3.5×10^{-11} |
| MI403 | 8.9×10^4 | 4.0×10^{-5} | 4.5×10^{-10} |
| MS502 | 1.9×10^7 | 4.3×10^{-3} | 2.3×10^{-10} |

Пример 3. Способ получения MS502 клона антитела с созреванием аффинности.

3-1. Дизайн библиотеки MS502 клона с созреванием аффинности.

Аминокислотная последовательность антимезотелинового MS502 клона была внесена в Swiss model homepage (<http://swissmodel.expasy.org/>), чтобы выявить базовую последовательность. 50 последовательностей было найдено на основе гомологичных последовательностей, и было проведено моделирование

путем установления каждой последовательности в качестве матрицы. 50 последовательностей было перечислено по приоритету, исходя из QMEAN4 значений (CB, all atom, сольватация, вращение), и матрица была выбрана с учетом идентичности последовательности и разрешения в дополнение к QMEAN4 значениям. Згба. 1.B выбрали для варибельной области тяжелой цепи, и 3qhz.1.B (LCDR1,2) и 4o51.1.A (LCDR3) выбрали для варибельной области легкой цепи. Структура MS502, полученная на основе выбранной матрицы, была проанализирована с помощью программы rumol, и паратоп был выбран, исходя из "выпячивания" аминокислоты CDR (смотри фиг. 1). Из них VL CDR2 Y49, Y50, K53 были исключены из кандидатных аминокислот на мутацию даже в том случае, если предполагалось, что они являются паратопами, поскольку Tyr и Lys являются аминокислотами, как правило, оказывающими положительное действие на связывание. Введение мутации было смоделировано путем 50% сохранения существующей последовательности, увеличения частоты встречаемости Tyr, Ser, Gly и контролирования нуклеотидной последовательности с использованием handmix праймера (IDT, США), так что частоты включения гидрофильных, гидрофобных, положительно заряженных и отрицательно заряженных аминокислот были одинаковы (табл. 9). Варибельная область тяжелой цепи была подразделена в каждый из трех фрагментов, поскольку мутация была введена во все CDR1, 2, и 3, и была проведена ПЦР фрагментов и ПЦР с перекрывающимися праймерами для создания библиотеки, и варибельная область легкой цепи была подразделена в каждый из двух фрагментов, поскольку мутация была введена только в CDR1 и 3, и они подвергались ПЦР фрагментов и ПЦР с перекрывающимися праймерами для создания библиотеки. Теоретический размер библиотеки в соответствии с введением мутации в случае варибельной области тяжелой цепи был 5.83×10^{10} , и теоретический размер библиотеки в соответствии с введением мутации в случае варибельной области легкой цепи был 2.16×10^4 .

Таблица 9

| HCDR1 | | | | | | | | | | | |
|-------|------|------|------|-----|------|------|------|-----|------|------|------|
| N31 | | | Y32 | | | A33 | | | | | |
| Tyr | 7 | THR | 7 | Tyr | 49 | THR | 1 | Tyr | 0.5 | THR | 7 |
| Ser | 8 | Gln | 0 | Ser | 8 | Gln | 0 | Ser | 7.5 | Gln | 0.5 |
| Gly | 1 | Asn | 49 | Gly | 1 | Asn | 7 | Gly | 7 | Asn | 0.5 |
| Arg | 1 | Ala | 1 | Arg | 1 | Ala | 1 | Arg | 1.5 | Ala | 49 |
| Lys | 0 | Val | 1 | Lys | 0 | Val | 1 | Lys | 0.5 | Val | 7 |
| His | 7 | Leu | 1 | His | 7 | Leu | 1 | His | 0.5 | Leu | 1.5 |
| Glu | 0 | Met | 0 | Glu | 0 | Met | 0 | Glu | 3.5 | Met | 0.25 |
| Asp | 7 | Ile | 7 | Asp | 7 | Ile | 1 | Asp | 3.5 | Ile | 0.75 |
| Phe | 1 | Pro | 1 | Phe | 7 | Pro | 1 | Phe | 0.5 | Pro | 7 |
| TRP | 0 | Cys | 1 | TRP | 0 | Cys | 7 | TRP | 0.25 | Cys | 0.5 |
| | | STOP | 0 | | | STOP | 0 | | | STOP | 0.75 |
| HCDR2 | | | | | | | | | | | |
| D53 | | | G55 | | | S56 | | | | | |
| Tyr | 7 | THR | 1 | Tyr | 0.5 | THR | 1 | Tyr | 17.5 | THR | 7 |
| Ser | 2 | Gln | 0 | Ser | 4.5 | Gln | 0.5 | Ser | 49 | Gln | 0 |
| Gly | 7 | Asn | 7 | Gly | 49 | Asn | 0.5 | Gly | 0 | Asn | 2.5 |
| Arg | 1 | Ala | 7 | Arg | 10.5 | Ala | 7 | Arg | 0 | Ala | 7 |
| Lys | 0 | Val | 7 | Lys | 0.5 | Val | 7 | Lys | 0 | Val | 0.5 |
| His | 7 | Leu | 1 | His | 0.5 | Leu | 1.5 | His | 2.5 | Leu | 0.5 |
| Glu | 0 | Met | 0 | Glu | 3.5 | Met | 0.25 | Glu | 0 | Met | 0 |
| Asp | 49 | Ile | 1 | Asp | 3.5 | Ile | 0.75 | Asp | 2.5 | Ile | 0.5 |
| Phe | 1 | Pro | 1 | Phe | 0.5 | Pro | 1 | Phe | 3.5 | Pro | 7 |
| TRP | 0 | Cys | 1 | TRP | 1.75 | Cys | 3.5 | TRP | 0 | Cys | 0 |
| | | STOP | 0 | | | STOP | 2.25 | | | STOP | 0 |
| HCDR3 | | | | | | | | | | | |
| L98 | | | S99 | | | F100 | | | | | |
| Tyr | 0.5 | THR | 1 | Tyr | 14 | THR | 7 | Tyr | 10.5 | THR | 1.5 |
| Ser | 1.5 | Gln | 3.5 | Ser | 49 | Gln | 0 | Ser | 7.75 | Gln | 0 |
| Gly | 1 | Asn | 0.5 | Gly | 0 | Asn | 2 | Gly | 0.25 | Asn | 2.25 |
| Arg | 7.5 | Ala | 1 | Arg | 0 | Ala | 7 | Arg | 0.5 | Ala | 0.5 |
| Lys | 0.5 | Val | 7 | Lys | 0 | Val | 1 | Lys | 0 | Val | 3.5 |
| His | 3.5 | Leu | 52.5 | His | 2 | Leu | 1 | His | 1.5 | Leu | 7 |
| Glu | 0.5 | Met | 1.75 | Glu | 0 | Met | 0 | Glu | 0 | Met | 0 |
| Asp | 0.5 | Ile | 5.25 | Asp | 2 | Ile | 1 | Asp | 0.75 | Ile | 10.5 |
| Phe | 3.5 | Pro | 7 | Phe | 7 | Pro | 7 | Phe | 49 | Pro | 1 |
| TRP | 0.25 | Cys | 0.5 | TRP | 0 | Cys | 0 | TRP | 0 | Cys | 3.5 |
| | | STOP | 0.75 | | | STOP | 0 | | | STOP | 0 |
| LCDR1 | | | | | | | | | | | |
| S30 | | | | | | | | | | | |
| Tyr | 18.8 | THR | 7 | | | | | | | | |
| Ser | 52.5 | Gln | 0 | | | | | | | | |
| Gly | 0 | Asn | 2.5 | | | | | | | | |
| Arg | 0 | Ala | 7 | | | | | | | | |
| Lys | 0 | Val | 0.5 | | | | | | | | |
| His | 2.5 | Leu | 0.5 | | | | | | | | |
| Glu | 0 | Met | 0 | | | | | | | | |
| Asp | 2.5 | Ile | 0.5 | | | | | | | | |
| Phe | 3.75 | Pro | 7 | | | | | | | | |
| TRP | 0 | Cys | 0 | | | | | | | | |
| | | STOP | 0 | | | | | | | | |
| LCDR3 | | | | | | | | | | | |
| W92 | | | S94 | | | N95b | | | | | |
| Tyr | 0 | THR | 2 | Tyr | 14 | THR | 7 | Tyr | 7 | THR | 7 |
| Ser | 14 | Gln | 0 | Ser | 49 | Gln | 0 | Ser | 8 | Gln | 0 |
| Gly | 6 | Asn | 0 | Gly | 0 | Asn | 2 | Gly | 1 | Asn | 49 |
| Arg | 12 | Ala | 2 | Arg | 0 | Ala | 7 | Arg | 1 | Ala | 1 |
| Lys | 0 | Val | 2 | Lys | 0 | Val | 1 | Lys | 0 | Val | 1 |
| His | 0 | Leu | 16 | His | 2 | Leu | 1 | His | 7 | Leu | 1 |
| Glu | 0 | Met | 2 | Glu | 0 | Met | 0 | Glu | 0 | Met | 0 |
| Asp | 0 | Ile | 0 | Asp | 2 | Ile | 1 | Asp | 7 | Ile | 7 |
| Phe | 0 | Pro | 2 | Phe | 7 | Pro | 7 | Phe | 1 | Pro | 1 |
| TRP | 42 | Cys | 0 | TRP | 0 | Cys | 0 | TRP | 0 | Cys | 1 |
| | | STOP | 0 | | | STOP | 0 | | | STOP | 0 |

3-2. Создание библиотеки варибельной области легкой цепи.

Для того, чтобы ввести мутацию в библиотеку, сначала варибельную область легкой цепи разделили на две части и провели ПЦР фрагментов. Фрагмент No. 1 варибельной области легкой цепи имел последовательность гена варибельной области легкой цепи антимезотелинового MS502 клона в качестве матрицы, к нему добавили прямой праймер (SEQ ID NO: 93) и обратный праймер (SEQ ID NO: 94); и фрагмент No. 2 варибельной области легкой цепи имел последовательность гена варибельной области легкой цепи антимезотелинового MS502 клона в качестве матрицы, к нему добавили прямой праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 95) и обратный праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 96), а затем была проведена ПЦР каждого фрагмента с использованием полимеразной смеси Primestar (Takara). ПЦР проводилась путем экспозиции при 98°C в течение 2 мин, затем повтора экспозиций при 98°C в течение 10 с, при 60°C в течение 15 с и при 72°C в течение 20 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были выделены с использованием набора для выделения из геля, (QI-Aquick Gel Extraction Kit, кат. № 28706, QIAGEN) соответственно. Константная область легкой цепи имела участок лямбда легкой цепи в качестве матрицы, сюда добавили прямой праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 97) и обратный праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 98) и была проведена ПЦР каждого фрагмента с использованием полимеразной смеси Primestar polymerase premix. ПЦР проводилась путем экспозиции при 98°C в течение 2 мин и затем путем повтора экспозиций при 98°C в течение 10 с, при 60°C в течение 15 с и при 72°C в течение 30 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Полученные фрагменты 1 и 2 варибельной области легкой цепи и константной области легкой цепи при молярном отношении 1:1:1 использовали в качестве матрицы, к которой были добавлены прямой праймер (SEQ ID NO: 92) и обратный праймер (SEQ ID NO: 98), и была проведена ПЦР каждого фрагмента с использованием готовой смеси Primestar polymerase premix. ПЦР проводили путем экспозиции при 98°C в течение 2 мин, и затем путем повтора экспозиций при 98°C в течение 20 с, при 60°C в течение 30 с и при 72°C в течение 60 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были выделены с использованием набора для выделения из геля, чтобы выделить ген созревания аффинности варибельно-константного участка легкой цепи. Проводили реакцию выделенного гена с рестрикционными ферментами NruI и XbaI (NEB) при 37°C в течение 4 ч. Прореагировавшие с рестрикционными ферментами гены снова были разделены в 1%-ном агарозном геле. Выделенный ген был вставлен в линейный pComb3X вектор, содержащий MS502 варибельно-константный участок тяжелой цепи, по сайтам NruI XbaI, с помощью T4 ДНК лигазы (кат. № M0203S, NEB). Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), которые культивировали в 300 мл LB среды при 37°C и при 220 об/мин в течение 1 ч. Затем полученный материал обработали 150 мкл карбенициллина и 300 мкл тетрациклина и культивировали при 37°C при перемешивании 220 об/мин в течение 1 ч. Полученный материал обработали VCS M13 хелперным фагом 4.5 мл (10^{11} pfu) и культивировали при 37°C и при перемешивании 220 об/мин в течение 1 ч, и обработали 300 мкл канамицина и 300 мкл карбенициллина, и культивировали в течение ночи при 37°C при перемешивании со скоростью 220 об/мин. На следующий день культивированные клетки центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин, и супернатант перенесли в новый сосуд. Для того, чтобы осадить фаг, 5X PEG/NaCl разводили до 1X PEG/NaCl и добавляли к супернатанту, и полученный продукт выдерживали на льду в течение 30 мин. Осажденный фаг центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отбросили, а осажденный фаг ресуспендировали с 10 мл PBS. Для удаления клеточного дебриса фаг, растворенный в 10 мл PBS, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин, чтобы отделить супернатант, и хранили при 4°C. Размер библиотеки подтвердили путем взятия 100 мкл культуральной жидкости через 1 ч после трансформации, которую высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, в серийных разведениях, культивировали при 37°C в течение 12 ч или более и подсчитывали колонии.

3-3. Создание библиотеки варибельной области тяжелой цепи.

Для того, чтобы ввести мутацию в библиотеку, сначала варибельную область тяжелой цепи разделили на 3 части и провели ПЦР фрагментов. Фрагмент No. 1 варибельной области тяжелой цепи имел последовательность гена варибельной области тяжелой цепи антимезотелин MS502 клона в качестве матрицы, к нему добавили прямой праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 99) и обратный праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 100); и фрагмент No. 2 варибельной области тяжелой цепи имел последовательность гена варибельной области тяжелой цепи антимезотелин MS502 клона в качестве матрицы, к нему добавили прямой праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 101) и обратный праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 102); и фрагмент No. 3 варибельной области тяжелой цепи имел последовательность гена варибельной области тяжелой цепи антимезотелин MS502 клона в качестве матрицы, и к нему добавили прямой праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 103) и обратный праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 104), и затем была проведена ПЦР каждого фрагмента с использованием полимеразной смеси Primestar polymerase premix (Takara). ПЦР проводилась путем экс-

позиции при 98°C в течение 2 мин и затем повтора экспозиций при 98°C в течение 10 с, при 60°C в течение 15 с и при 72°C в течение 20 с 30 раз и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Полученные фрагменты варибельной области тяжелой цепи 1, 2 и 3 при молярном соотношении 1:1:1 использовали в качестве матрицы, к которой добавляли прямой праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 99) и обратный праймер (табл. 10: SEQ ID NO: 106), и проводили ПЦР каждого фрагмента с использованием полимеразной смеси Primestar. ПЦР проводилась путем экспозиции при 98°C в течение 2 мин и затем путем повтора экспозиций при 98°C в течение 20 с, при 60°C в течение 30 с и при 72°C в течение 60 с в ходе 30 циклов, и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля, чтобы выделить ген варибельной области тяжелой цепи созревшей аффинности. Проводили реакцию изолированного гена с рестрикционными ферментами XhoI и ApaI (NEB) при 37°C в течение 4 ч. Прореагировавшие с рестрикционными ферментами гены снова были разделены в 1%-ном агарозном геле. Выделенный ген вставили в линейный pComb3X вектор, содержащий MS502 варибельно-константную область легкой цепи, по сайтам XhoI, ApaI, с помощью T4 ДНК лигазы (кат. № M0203S, NEB). Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), которые затем культивировали в 300 мл LB среды при 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 1 ч. Затем полученный материал обработали 150 мкл карбенициллина и 300 мкл тетрациклина и культивировали суспензию при 37°C и при 220 об/мин в течение 1 ч. Полученный материал обработали VCS M13 хелперным фагом 4.5 мл (10¹¹ pfu) и культивировали при встряхивании при 37°C и при 220 об/мин в течение 1 ч и обработали 300 мкл канамицина и 300 мкл карбенициллина, и культивировали в течение ночи при 37°C и при 220 об/мин. На следующий день культивированные клетки центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин, и супернатант перенесли в новый сосуд. Для осаждения фага 5X PEG/NaCl разводили до 1X PEG/NaCl и добавляли к супернатанту, полученный продукт выдерживали на льду в течение 30 мин. Осажденный фаг центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отбросили, а осажденный фаг ресуспендировали с 10 мл PBS. Для того, чтобы удалить клеточный дебрис, фаг, растворенный в 10 мл PBS, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин, чтобы отделить супернатант, и хранили при 4°C. Размер библиотеки подтвердили путем взятия 100 мкл культуральной жидкости через 1 ч после трансформации, которую высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, в серийных разведениях, культивировали при 37°C в течение 12 ч или более, а затем подсчитывали колонии.

Таблица 10

| Название | Последовательность нуклеотидов | SEQ ID NO: |
|-------------------------|---|------------|
| MS502 VL FR1 Fo NruI | GC Tcgcgattgcagtggcactggctggttcctaccgtggcccccagcgccc CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA | 94 |
| MS502 VL FR1 Fo | CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA | 95 |
| MS502 VL FR1 Re | GAG CTG CTG GTA CCA GGA GAC AGC ATT RX5X4 GCC AAT ATT AGA TGA AGA GCC AGT ACA AGA | 96 |
| MS502 VL FR2 Fo | GCC AAT ATT AGA TGA AGA GCC AGT ACA AGA | 97 |
| MS502 VL FR2 Re | ACC TAG GAC GGT CAC CTT GGT GCC TCC GCC GAA GAC ATA ACC RX3X3 CAG GCT RX7X4 ATC CX8X4 AGA ACC ACA GTA ATA ATC AGC CTC ATC CTC GGA | 98 |
| MS502 CL Fo | GGC ACC AAG GTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCC AAC CCC ACT GTC | 99 |
| MS502 CL Re | GCT CTA GAA CAT TCT GTA GGG GCC ACT GTC TTC TC | 100 |
| MS502 VH FR1 Fo NcoI | gcccatggccc GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG | 101 |
| MS502 VH FR1 Re | AGC CTG GCG GAC CCA GCT CAT NX1X2 RX3X4 RX3X3 GCT AAA GGT GAA TCC AGA GGC CGC ACA | 102 |
| MS502 VH FR2 Fo | atgagctgggtccgagget | 103 |
| MS502 VH FR2 Re | GGT GAA CCG ACC TCT TAC AGA ATC AGC GTA ATA TTT RX5X4 NX2X2 ACT RX3X2 AGG AGG GAT CCC TGA GAC CCA CTC | 104 |
| MS502 VH FR3 Fo | AAA TAT TAC GCT GAT TCT GTA AGA GGT CGG TTC ACC | 105 |
| MS502 VH FR3 Re | TGA GCT CAC CGT GAC CAG TGT ACC CTG GCC CCA GTA GTC RX6X6 RX7X4 NX4X1 CAT ATT TTT CGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT | 106 |
| MS502 VH Re | TGA GCT CAC CGT GAC CAG TGT ACC CTG | 107 |
| MS502 VH Re ApaI | GCG GGC CCT TGG TGG AGG CTG AGC TCA CCG TGA CCA GTG TAC CCT G | 108 |

В табл. 10 кодон X является вырожденным кодоном, в котором каждый ACGT контролируется на специфическом уровне, и способен контролировать количество аминокислот, которые должны транслироваться. В качестве примера для кодона NX1X2 последовательности SEQ ID NO: 102 N кодируется A, C, G, T со случайным соотношением, X1 кодируется в 10% случаев A, в 10% случаев C, в 70% случаев G и в 10% случаев T, и X2 кодируется в 10% случаев A, в 70% случаев C, в 10% случаев G и в 10% случаев T. Это предназначается для обратного праймера, и таким образом, при обращении в прямом направлении это окажется кодон X2X1N, в котором X2 кодируется в 10% случаев A, в 70% случаев C, в 10% случаев G и в 10% случаев T, и X1 кодируется в 10% случаев A, в 10% случаев C, в 70% случаев G и в 10% слу-

чаев Т. В результате, Kabat No. 31 варибельной области тяжелой цепи CDR1 транслируется в аминокислоты, Tyr 7%, Ser 8%, Gly 1%, His 7%, Asp 7%, Phe 1%, Thr 7%, Asn 49%, Ala 1%, Val 1%, Leu 1%, Ile 7%, Pro 1%, Cys 1%.

3-4. Селекция антитела с мутацией варибельной области легкой цепи.

1 мл рекомбинантного человеческого белка MSLN, имеющего концентрацию 1 мкг/мл, поместили в полистироловую пробирку для твердофазного анализа (кат. № 444202, Nunc), и покрытую в течение 12 ч или более при 4°C пробирку промыли 5 мл 0,05% PBST три раза. 5 мл 1% BSA/PBS поместили в пробирку, покрытую MSLN для иммуно-анализа, а затем блокировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Блокирующий буфер удалили из пробирки для иммуно-анализа, и затем фаговую библиотеку варибельной области легкой цепи обработали в пробирке и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем полученный продукт промывали 5 мл PBST четыре раза. Пробирку для иммуно-анализа обработали 1 мл глицинового (pH 2.0) элюирующего буфера и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 10 мин, чтобы получить супернатант. После элюирования 100 мкл 1.5M Tris-Cl (pH 8.8) добавили к фагу и нейтрализовали. 10 мл XL1-Blue бактерий (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), культивированные в течение примерно 2 ч (OD_{600} от 0,8 до 1,0), обработали нейтрализованным фагом. После инфицирования при комнатной температуре в течение 30 мин, 10 мл SB, 20 мкл тетрациклина (50 мг/мл) и 10 мкл карбенициллина (100 мг/мл) добавили к 10 мл инфицированных XL1-Blue бактерий (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene) и культивировали при встряхивании (200 об/мин) при 37°C в течение 1 ч. Бактерии обработали 1 мл VCSM13 хелперного фага ($> 10^{11}$ pfu/мл) и культивировали при встряхивании (200 об/мин) при 37°C в течение 1 ч. После 1 ч инкубации к культуре бактерий добавили 80 мл SB, 100 мкл канамицина и 100 мкл карбенициллина (100 мг/мл) и культивировали в течение ночи (200 об/мин) при 37°C. Библиотеку, культивированную в течение ночи, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, чтобы отделить супернатант, 5X PEG/NaCl разводили до 1X PEG/NaCl и добавляли к супернатанту, полученному продукту давали возможность постоять на льду в течение 30 мин. Супернатант удаляли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин, а осадки ресуспендировали с 2 мл 1% BSA/PBS и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Затем был взят только супернатант, который использовали в пэннинге следующего порядка. Этот процесс повторяли четыре раза.

3-5. Селекция антител с мутацией варибельной области тяжелой цепи.

Супернатант удаляли с помощью 50 мкл микрогранул со стрептавидином (Miltenyl biotec 130-048-101), для проведения промывки (3 раза) добавляли 1 мл PBS. 1 мл PBS, содержащий 1% BSA, добавили к гранулам, гранулы перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем блокировали. 50 нМ MSLN поместили в 500 мкл PBS, смешали с 500 мкл MS502 V_H фаговой библиотеки и проводили реакцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Блокирующий буфер удалили из гранул, гранулы обработали раствором, содержащим MSLN и фаг, и дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем полученный продукт промыли 1 мл PBST шесть раз. Гранулу обработали 1 мл глицинового (pH 2.0) элюирующего буфера и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 10 мин, чтобы получить супернатант. После элюирования добавили к фагу 100 мкл 1,5M Tris-Cl (pH 8.8) и нейтрализовали. 10 мл XL1-Blue бактерий (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), культивированных в течение примерно от 2 до 2,5 ч (OD_{600} от 0,8 до 1,0), обработали нейтрализованным фагом. После инфицирования при комнатной температуре в течение 30 мин добавили 10 мл SB, 20 мкл тетрациклина (50 мг/мл) и 10 мкл карбенициллина (100 мг/мл) к 10 мл инфицированных XL1-Blue бактерий (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene) и культивировали при встряхивании (200 об/мин) при 37°C в течение 1 ч. Бактерии обработали 1 мл VCSM13 хелперного фага ($> 10^{11}$ pfu/мл) и культивировали суспензию клеток (200 об/мин) при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в течение 1 ч бактерии обработали 80 мл SB, 100 мкл канамицина и 100 мкл карбенициллина (100 мг/мл) и культивировали в течение ночи (200 об/мин) при 37°C. Культивированную в течение ночи библиотеку центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, чтобы отделить только супернатант, и использовали 5X PEG/NaCl, чтобы добавить 1X PEG/NaCl к супернатанту, и полученный продукт выдерживали на льду в течение 30 мин. Супернатант удалили центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин, осадки ресуспендировали, используя 2 мл 1% BSA/PBS, и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Затем взяли только супернатант и использовали в пэннинге следующего порядка. В общей сложности первичный, вторичный и третичный пэннинг зерен в отношении MSLN были проведены с использованием MS502 V_H фаговой библиотеки. В результате вторичного и третичного пэннингов было подтверждено увеличение выходящих титров, что показывает, что были амплифицированы антитела против MSLN.

3-6. Получение отдельных клонов в соответствии с ELISA.

Отдельные колонии каждой библиотеки варибельных областей легкой цепи/тяжелой цепи после финальной амплификации собирали и культивировали с 1,5 мл SB/карбенициллина до OD_{600} 0,8-1,0 при 37°C и при 220 об/мин, а затем культивировали с 1 мМ IPTG при 37°C и при 220 об/мин в течение 12 ч или более. Материалы реакции центрифугировали при 5500 об/мин в течение 5 мин, супернатант добавили в планшеты ELISA, содержащие подложку MSLN антигена, и дали возможность прореагировать

при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем полученные материалы четыре раза промыли PBST (1XPBS, 0.05% Твин 20), сюда добавили HRP/анти-hFab-HRP конъюгат, разведенный 1/5000 с помощью 1% BSA/1XPBS, дали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 1 ч и промыли PBST (1XPBS, 0.05% Твин 20) 4 раза. Затем добавили ТМБ раствор, дали постоять в течение 5-10 мин, а затем добавили ТМБ стоп-раствор. Затем измеряли значения OD при длине волны 450 нм, используя фотометр TECAN Sunrise, и клоны, имеющие высокое значение OD, считались отдельными клонами.

В результате, как показано в табл. 11, были отобраны клоны, специфически связывающиеся с человеческим MSLN, и их аминокислотные последовательности были установлены.

Табл. 12 показывает CDR аминокислотные последовательности клонов антител из табл. 11, исходя из нумерации по Kabat.

Таблица 11

| Клон | Вариантная область | Аминокислотная последовательность | SEQ ID NO: |
|------|--------------------|---|------------|
| C2G1 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSGSKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFLSFDYWGQGLTIVTSS | 48 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGPNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKVTVLG | 109 |
| C2G4 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSGSKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFLSFDYWGQGLTIVTSS | 48 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDPSLNGYVFGGGTKVTVLG | 110 |
| C3C8 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSGSKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFLSFDYWGQGLTIVTSS | 48 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGPNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDSLNGYVFGGGTKVTVLG | 111 |
| 54 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIYDSSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNIYTFDYWGQGLTIVTSS | 112 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKVTVLG | 49 |
| 56 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSASKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFLSFDYWGQGLTIVTSS | 113 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKVTVLG | 49 |
| 2-30 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSNSKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMRTFDYWGQGLTIVTSS | 114 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKVTVLG | 49 |
| 2-73 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSNSKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFLSFDYWGQGLTIVTSS | 115 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGNSVSWYQQLP GTAPKLLIYDHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLRSE DEADYYCGAWDDSLNAYVFGGGTKLTVLG | 49 |
| 2-78 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIPDPSGSKYYADSVRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFLSFDYWGQGLTIVTSS | 116 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQLP GTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGSWDSSLNGYVFGGGTKVTVLG | 49 |

Таблица 12

| клон | Вариабельная область | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|------|----------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------|
| C2G1 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDGSGSKYYADSV RG (SEQ ID NO: 65) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGPNAVS (SEQ ID NO: 117) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLSGYV (SEQ ID NO: 118) |
| C2G4 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDGSGSKYYADSV RG (SEQ ID NO: 65) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119) |
| C3C8 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDGSGSKYYADSV RG (SEQ ID NO: 65) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGPNAVS (SEQ ID NO: 117) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSDLRGYV (SEQ ID NO: 120) |
| 54 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDSSSKYYADSV R (SEQ ID NO: 121) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |
| 56 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDASASKYYADSV RG (SEQ ID NO: 122) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |
| 2-30 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDNSKYYADSV RG (SEQ ID NO: 123) | HMRTFDY (SEQ ID NO: 124) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |
| 2-73 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPNDSKYYADSV RG (SEQ ID NO: 125) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |
| 2-78 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDGSGSKYYADSV RG (SEQ ID NO: 65) | HMFYD (SEQ ID NO: 126) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAVS (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69) |

3-7. Относительное сравнение и селекция по силе связывания отдельных клонов с использованием SPR.

Для того, чтобы сравнить и измерить силу связывания с культуральной жидкостью отдельных клонов, выделенных при подтверждении отдельных клонов согласно методу ELISA, осуществленному в примере 3-3, сначала человеческий MSLN на чипе Biacore серия S CM5 (GE healthcare) развели в pH 4.0 ацетатном буфере до концентрации 1 мкг/мл и пропустили через ячейку при скорости потока 10 мкл/мин и фиксировали до 1000 Ru. Супернатант Fab, экспрессированный в примере 3-6, разбавили 1/10 буфером pH 7.4 HBS-EP и пропустили через ячейку при скорости потока 30 мкл/мин для ассоциации в течение 120 с, и диссоциации в течение 180 с для проведения анализа связывания. Регенерацию проводили при помощи 10 mM глицин-HCl pH 1.5 буфера в течение 30 с. Результаты анализа связывания ELISA и SPR сравнивали и анализировали, чтобы выбрать конечные клоны вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи.

В результате, как показано на фиг. 2 и 3, сила связывания мутаций вариабельной области легкой цепи и мутаций вариабельной области тяжелой цепи были относительно сравнимы, и C2G1, C2G4 и C3C8 были выбраны для конечных клонов вариабельной области легкой цепи и 56, 2-30, 2-58, 2-73, и 2-78 были выбраны для конечных клонов вариабельной области тяжелой цепи.

3-8. Клонирование гена IgG клона MS502 антитела с мутацией вариабельной области легкой цепи.

Каждый из изолированных генов вариабельной области легкой цепи C2G1, C2G4, и C3C8 в качестве матрицы был подвергнут ПЦР с использованием ДНК полимеразы PrimeSTAR HS (кат. № R010B; Takara), прямого праймера, содержащего NotI (табл. 6: SEQ ID NO: 86), и обратного праймера (табл. 6: SEQ ID NO: 87). Затем проводилась ПЦР константной области каппа-легкой цепи антитела человека с прямым праймером (табл. 6: SEQ ID NO: 88) и обратным праймером (табл. 6: SEQ ID NO: 89). ПЦР проводилась путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин и затем путем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов, и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем соответствующие вариабельные области легкой цепи и константные области легкой цепи смешивали, проводили ПЦР с перекрывающимися праймерами, так что происходило клонирование генов, экспрессирующих области легких цепей. ПЦР проводилась путем экспозиции при 94°C в течение 10 мин и затем путем повтора экспозиций при 94°C в течение 15 с, при 56°C в течение 30 с и при 72°C в течение 90 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 10 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем проводили реакцию выделенных генов с рестрикционными ферментами NotI, Hin-

dIII при 37°C в течение 12 ч или более, и гены, прореагировавшие с рестрикционными ферментами, снова были разделены на 1%-ном агарозном геле. Также была проведена рестрикция плазмидного вектора pClW, как описано выше, и разделение (фрагментов) на агарозном геле. Выделенные гены областей легких цепей C2G1, C2G4 и C3C8 были вставлены в линейный pClW вектор по сайтам NotI, HindIII с помощью T4 DNA лигазы (кат. № M0203S, New England BioLabs (NEB)). Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), которые высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 12 ч или более. Затем отбирали отдельные колонии и культивировали их, и плазмиды отделяли при помощи миниатора для выделения плазмид (кат. № 27405, QIAGEN) и подтверждали секвенированием ДНК.

3-9. Клонирование гена IgG клона MS502 антитела с мутацией варибельной области тяжелой цепи.

Каждый из генов варибельных областей тяжелой цепи 56, 2-30, 2-58, 2-73 и 2-78 в качестве матрицы был подвергнут ПНР с использованием PrimeSTAR HS ДНК полимеразы (кат. № R010B; Takara), прямого праймера, содержащего NotI (табл. 6: SEQ ID NO: 90), и обратного праймера, содержащего ApaI (табл. 6: SEQ ID NO: 91). ПНР проводилась путем экспозиции при 98°C в течение 2 мин и затем путем повтора экспозиций при 98°C в течение 10 с, при 58°C в течение 10 с и при 72°C в течение 30 с в ходе 30 циклов и завершения реакции при 72°C в течение 5 мин. Предполагаемая длина полосок ДНК, соответствующих амплифицированным генам, была подтверждена в 1%-ном агарозном геле, и они были разделены с использованием набора для выделения из геля соответственно. Затем проводили реакцию трех видов выделенных генов с рестрикционными ферментами KpnI, ApaI при 37°C в течение 4 ч. Гены, прореагировавшие с рестрикционными ферментами, снова были разделены на 1%-ном агарозном геле. Также была проведена рестрикция плазмидного вектора pClW, как описано выше, и разделение (фрагментов) на агарозном геле. Разделенные гены были вставлены в линейный pClW вектор, содержащий человеческую константную область тяжелой цепи, по сайтам NotI, ApaI с помощью T4 ДНК лигазы. Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; кат. № 200228, Stratagene), которые высевали на чашку со средой LB (кат. № LN004CA, NaraeBiotech), содержащей карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 12 ч или более. Затем отбирали отдельные колонии и культивировали их, и плазмиды отделяли при помощи миниатора для выделения плазмид (кат. № 27405, QIAGEN) и подтверждали секвенированием ДНК.

3-10. Получение и очистка IgG клона MS502 антитела с мутацией варибельной области легкой цепи.

Для того, чтобы получить и очистить антитела с мутацией варибельной области легкой цепи C2G1, C2G4, и C3C8, Expi293F™ клетки высевали при концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл за день до трансфекции. После инкубации (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 24 ч добавили среду для экспрессии Expi293™ (кат. № A1435101, Gibco), чтобы приготовить 30 мл культуры с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность=95%). 30 мкг ДНК (pClW-MS502 варибельная область тяжелой цепи: 15 мкг, pClW-антимезотелин с мутацией варибельной области легкой цепи: 15 мкг) развели в среде OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco), так, чтобы получился общий объем 1,5 мл, и давали возможность прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. 1,5 мл OptiPro™ SEM среды (кат. № 12309019, Gibco) смешали с 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco) так, что общий объем составил 1,5 мл, и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. После прохождения реакции в течение 5 мин 1,5 мл разбавленной ДНК и 1,5 мл разбавленного ExpiFectamine™ 293 реагента хорошо смешали друг с другом и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Клетки Expi293F™ обработали 3 мл смеси ДНК и реагента ExpiFectamine™ 293. После культивирования суспензии клеток (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 16-18 ч добавили 150 мкл ExpiFectamine™ 293 эхансера 1 (кат. № A14524, Gibco) и 1,5 мл ExpiFectamine™ 293 эхансера 2 (кат. № A14524, Gibco), а затем культивировали суспензию клеток в течение 5 дней. После культивирования клеточный дебрис удалили центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, и супернатант пропустили через 0,22 мкм фильтр. MabSelect Xtra (кат. № 17-5269-02, GE Healthcare), который представляет собой аффинный носитель с белком А (100 мкл), готовили для каждого 30 мл культуральной жидкости, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин для удаления исходного раствора и полученный продукт промывали 400 мкл буфера для связывания белка А (кат. № 21007, Pierce) 3 раза. Носитель с белком А добавляли для приготовления культуральной жидкости и проводили реакцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной жидкости и носителя помещали в спин-колонку с крышкой-защелкой Pierce (кат. № 69725, Thermo), и затем в колонку оставляли только смолу с помощью QIAvac 24 Plus (кат. № 19413, QIAGEN) вакуумного коллектора. Добавили 5 мл буфера для связывания белка А, чтобы промыть носитель, добавили 200 мкл элюирующего буфера для белка А (кат. № 21009, Pierce). Полученный материал ресуспензировали при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин и элюировали. Каждый элюат нейтрализовали добавлением 2,5 мкл 1.5M Tris-HCl (pH 9.0). Элюирование проводили от 4 до 6 раз, и каждую фракцию подвергали количественной оценке, используя Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Фракции, в которых обнаруживали

белок, собирали и переводили в буфер PBS (фосфатно-буферный раствор) при помощи колонок Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 мл (кат. № 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка (SDS-PAGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, чтобы окончательно подтвердить количественное значение концентрации и состояние антитела, и антитело хранили при 4°C.

3-11. Количественное измерение силы связывания MS502 антитела с мутацией варибельной области легкой цепи с антигеном MSLN.

Количественную силу связывания (аффинность) очищенных анти-MSLN антител, т.е. MS502 клона антител с мутацией варибельной области легкой цепи C2G1, C2G4 и C3C8, с рекомбинантным человеческим мезотелином (MSLN) измеряли с помощью биосенсора Biacore T-200 (GE Healthcare, США). MSLN (кат. № 3265-MS, R&D systems, США), выделенный из клеток HEK293, фиксировали на CM5 чипе (GE Healthcare, CAT. No. BR-1005-30), так чтобы соответствовать 200 Rmax при использовании амин-карбоксылной реакции. Затем клон C2G1 антитела, клон C2G4 антитела или клон C3C8 антитела, серийно разведенные HBS-EP буфером (10 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% поверхностно-активный P20) пропускали через ячейку при концентрации в диапазоне от 0,078 до 5 нМ и скорости потока 30 мкл/мин для ассоциации 120 с и для диссоциации 1800 с. Диссоциацию антитела, связанного с MSLN, индуцировали потоком 10 mM глицин-HCl pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с (табл. 13). Аффинность была получена как константы скорости движения (K_{on} и K_{off}) и равновесная константа диссоциации (K_D) с помощью программного обеспечения Biacore T-200 (табл. 14).

Таблица 13

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| SPR | Biacore T200 |
| Чип | CM5 |
| Подвижный буфер | HBS-EP pH7.4 |
| Скорость потока | 30 мкл/мин |
| Время ассоциации / диссоциации | 120 сек / 600 сек |
| IgG конц. | 0.078~5 нМ, 1/2 серийное разведение |
| Восстановление | 10 mM Глицин-HCl pH1.5, 30 сек |

Таблица 14

| | K_{on} | K_{off} | K_D |
|------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| C2G1 | 7.20×10^7 | 6.76×10^{-3} | 9.39×10^{-11} |
| C2G4 | 1.40×10^8 | 6.05×10^{-3} | 4.32×10^{-11} |
| C3C8 | 5.84×10^7 | 7.11×10^{-3} | 1.22×10^{-10} |

3-12. Получение и очистка IgG клона MS502 антитела с мутацией варибельной области тяжелой цепи.

Для того, чтобы получить и очистить антитела с мутацией варибельной области тяжелой цепи 56, 2-30, 2-58, 2-73, 2-78, клетки Expi293F™ высевали при концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл за день до трансфекции. После инкубации (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 24 ч добавили среду для экспрессии Expi293™ (кат. № A1435101, Gibco), чтобы приготовить 30 мл культуры с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность=95%). 30 мкг ДНК (pcIw-MS502 мутация варибельной области тяжелой цепи: 15 мкг, pcIw-MS502 варибельная область легкой цепи: 15 мкг) разбавили в среде OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco), так, чтобы получить общий объем 1,5 мл, и давали прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco) смешали с 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco), так что общий объем составлял 1,5 мл, и давали прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. После прохождения реакции в течение 5 мин 1,5 мл разбавленной ДНК и 1,5 мл разбавленного реагента ExpiFectamine™ 293 хорошо смешивали друг с другом и давали прореагировать при комнатной температуре в течение 20-30 мин. 3 мл смеси ДНК и реагента ExpiFectamine™ 293 добавили в клетки Expi293F™. После культивирования суспензии (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 16-18 ч добавили 150 мкл энхансера 1 ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco) и 1,5 мл энхансера 2 ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco), а затем культивировали суспензию в течение 5 дней. После культивирования клеточный дебрис удалили центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, а супернатант пропустили через фильтр 0.22 μm MabSelect Xtra (кат. № 17-5269-02, GE Healthcare), который представляет собой аффинный носитель с белком А (100 мкл), готовили для каждых 30 мл культуральной жидкости, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин для удаления исходного раствора и полученный продукт промывали 400 мкл буфера для связывания белка А (кат. № 21007, Pierce) 3 раза. Носитель с белком А добавляли для приготовления культуральной жидкости и проводили реакцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной жидкости и носителя помещали в спин-колонку с крышкой-защелкой Pierce (кат. № 69725, Thermo), а затем в колонке оставляли только смолу с помощью QIAvac 24 Plus (кат. № 19413, QIAGEN) вакуумного коллектора. Добавили 5 мл буфера для связывания белка А, чтобы промыть носитель, и добавили 200 мкл элюирующего буфера для белка А (кат. № 21009, Pierce). Полученный материал ресуспензировали при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин и элюировали. Каждый элюат нейтрализовали добавлением 2.5 мкл 1.5M Tris-HCl (pH 9.0). Элюирование проводили от 4 до 6 раз, и каждую фракцию подвергали количественной

оценке, используя Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Фракции, в которых обнаруживали белок, собирали и переводили в буфер PBS (фосфатно-буферный раствор) при помощи колонок Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 мл (кат. № 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка (SDS-PAGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, чтобы окончательно подтвердить количественное значение концентрации и состояние антитела, и антитело хранили при 4°C.

3-13. Получение и очистка IgG антитела с мутацией варибельной области тяжелой цепи в сочетании с конечным C2G4 клоном с мутацией варибельной области легкой цепи клона MS502.

Клон C2G4, имеющий самое лучшее значение при измерении аффинности среди мутаций варибельной области легкой цепи, был отобран и установлен как итоговый клон варибельной области легкой цепи. Затем, для того, чтобы объединить, получить и очистить антитела с мутацией варибельной области тяжелой цепи 56, 2-30, 2-58, 2-73 и 2-78, клетки Expi293F™ высевали при концентрации 2.5×10^6 клеток/мл за день до трансфекции. После инкубации (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 24 ч добавили среду для экспрессии Expi293™ (кат. № A1435101, Gibco), чтобы приготовить 30 мл продукта с концентрацией 2.5×10^6 клеток/мл (жизнеспособность=95%). 30 мкг ДНК (pcIw-MS502 антитело с мутацией варибельной области тяжелой цепи: 15 мкг, pcIw-мутация варибельной области легкой цепи C2G4: 15 мкг) растворили в OptiPro™ SEM среде (кат. № 12309019, Gibco) так, чтобы получить общий объем 1.5 мл, и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (кат. № 12309019, Gibco) смешали с 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 (кат. № A14524, Gibco) так, чтобы общий объем составлял 1,5 мл, и дали прореагировать при комнатной температуре в течение 5 мин. После прохождения реакции в течение 5 мин 1,5 мл разбавленной ДНК и 1,5 мл разбавленного реагента ExpiFectamine™ 293 хорошо смешали друг с другом, и дали прореагировать при комнатной температуре в течение от 20 до 30 мин. Клетки Expi293F™ обработали 3 мл смеси ДНК и 3 реагента ExpiFectamine™ 29. После культивирования суспензии клеток (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение от 16 до 18 ч добавили 150 мкл ExpiFectamine™ 293 энхансера 1 (кат. № A14524, Gibco) и 1,5 мл ExpiFectamine™ 293 энхансера 2 (кат. № A14524, Gibco), а затем культивировали суспензию в течение 5 дней. После культивирования клеточный дебрис удалили центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, и супернатант пропустили через фильтр 0.22 мкм. MabSelect Xtra (кат. №17-5269-02, GE Healthcare), который представляет собой аффинный носитель с белком А (100 мкл), готовили для каждых 30 мл культуральной жидкости, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин для удаления исходного раствора, и полученный продукт промывали 400 мкл буфера для связывания белка А (кат. № 21007, Pierce) 3 раза. Носитель с белком А добавляли для приготовления культуральной жидкости и проводили реакцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной жидкости и носителя помещали в спин-колонку Pierce (кат. № 69725, Thermo), а затем в колонку оставляли только смолу с помощью вакуумного коллектора QIAvac 24 Plus (кат. № 19413, QIAGEN). Добавили 5 мл буфера для связывания белка А, чтобы промыть носитель, сюда добавили 200 мкл элюирующего буфера для белка А (кат. № 21009, Pierce). Полученный материал ресуспензировали при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин и элюировали. Каждый элюат нейтрализовали добавлением 2,5 мкл 1,5М Tris-HCl (pH 9.0). Элюирование проводили от 4 до 6 раз и каждую фракцию подвергали количественной оценке, используя Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Фракции, в которых обнаруживали белок, собирали и переводили в буфер PBS (фосфатно-буферный раствор) при помощи колонок Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 мл (кат. № 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка (SDS-PAGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, чтобы окончательно подтвердить количественное значение концентрации и состояние антитела, и антитело хранили при 4°C.

Таблица 15

| Клон | Варибельная область | Аминокислотная последовательность | SEQ ID NO: |
|-----------|---------------------|--|------------|
| 56-C2G4 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIPDASKYYADSVRGRFTVSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMLSFDYWGQGLT VSS | 113 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSNIGSNVSWYQQL PGTAPKLLIYYNSKRPSGVDPDRFSGSKSASLAISGLRS EDEADYYCGSWDPSLNGYVFGGGTKVTVLG | 110 |
| 2-30-C2G4 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIPDASKYYADSVRGRFTVSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMRTFDYWGQGLT VSS | 114 |

| | | | |
|-----------|--------------|---|-----|
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQL PGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISGLRS EDEADYYCGSWDPSLNGYVFGGGTKVTVLG | 110 |
| 2-73-C2G4 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIPPNDSKYYADSVRGRFTVSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMLSFDYWGQGLTVT VSS | 115 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQL PGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISGLRS EDEADYYCGSWDPSLNGYVFGGGTKVTVLG | 110 |
| 2-78-C2G4 | тяжелая цепь | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIPPNDSKYYADSVRGRFTVSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMFSFDYWGQGLTVT VSS | 116 |
| | легкая цепь | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVSWYQQL PGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISGLRS EDEADYYCGSWDPSLNGYVFGGGTKVTVLG | 110 |

Таблица 16

| Клон | Вариабельная область | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|-----------|----------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|
| 56-C2G4 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDASKYYADSVR G (SEQ ID NO: 122) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAV (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119) |
| 2-30-C2G4 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDNSKYYADSVR G (SEQ ID NO: 123) | HMRTFDY (SEQ ID NO: 124) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAV (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 120) |
| 2-73-C2G4 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDNSKYYADSVR G (SEQ ID NO: 125) | HMLSFYD (SEQ ID NO: 66) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAV (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119) |
| 2-78-C2G4 | тяжелая цепь | NYAMS (SEQ ID NO: 59) | GIPPDNSKYYADSVR G (SEQ ID NO: 65) | HMFSDY (SEQ ID NO: 126) |
| | легкая цепь | TGSSSNIGSNAV (SEQ ID NO: 67) | YNSKRPS (SEQ ID NO: 68) | GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119) |

3-14: Количественное измерение силы связывания MS502 антитела с мутацией вариабельной области тяжелой цепи и комбинации C2G4 и антитела с мутацией вариабельной области тяжелой цепи с MSLN антигеном.

Количественная оценка силы связывания (аффинности) каждого из очищенных анти-MSLN антител, т.е. MS502 клон антител с мутацией вариабельной области тяжелой цепи 56, 2-30, 2-73, 2-78, и комбинации антител C2G4 с мутацией вариабельной области легкой цепи и антител с мутацией вариабельной области тяжелой цепи, включая 56-C2G4, 2-30-C2G4, 2-73-C2G4, 2-78-C2G4, с рекомбинантным человеческим мезотелином (MSLN) была выполнена с помощью биосенсора Biacore T-200 (GE Healthcare, США). MSLN (кат. № 3265-MS, R&D systems, США), выделенный из HEK293 клеток, фиксировали на CM5 чипе (GE Healthcare, CAT. No. BR-1005-30), так чтобы соответствовать 200 Rmax при использовании амин-карбоксильной реакции. Затем клон 56 антитела, клон 2-30 антитела, клон 2-73 антитела, клон 2-78 антитела, клон 56-C2G4 антитела, клон 2-30-C2G4 антитела, клон 2-73-C2G4 антитела и клон 2-78-C2G4 антитела, серийно разведенные буфером HBS-EP (10 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% поверхностно-активный агент P20), пропускали через ячейку при концентрации в диапазоне от 0,078 до 5нМ и скорости потока 30 мкл/мин для ассоциации в течение 120 с и для диссоциации в течение 1800 с. Диссоциацию антитела, связанного с MSLN, индуцировали потоком 10 mM глицин-HCl pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с (табл. 17). Аффинность была получена как константы скорости движения (K_{on} и K_{off}) и равновесная константа диссоциации (K_D) с помощью программного обеспечения Biacore T-200 (табл. 18).

Таблица 17

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| SPR | Biacore T200 |
| Чип | CM5 |
| Подвижный буфер | HBS-EP pH7.4 |
| Скорость потока | 30мкл/мин |
| Время ассоциации / диссоциации | 120 сек / 600 сек |
| IgG Конц. | 0.078~5 нМ, 1/2 серийное разведение |
| Восстановление | 10 mM Глицин-HCl pH1.5, 30 сек |

Таблица 18

| | K_{on} | K_{off} | K_D |
|-------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 56 | 1.26×10^7 | 1.57×10^{-3} | 1.25×10^{-10} |
| 2-30 | 1.92×10^8 | 3.19×10^{-2} | 1.66×10^{-10} |
| 2-78 | 1.50×10^8 | 2.44×10^{-3} | 1.63×10^{-11} |
| 56 - C2G4 | 6.61×10^7 | 1.08×10^{-2} | 1.63×10^{-10} |
| 2-30 - C2G4 | 1.15×10^8 | 2.70×10^{-2} | 2.34×10^{-10} |
| 2-73 - C2G4 | 8.98×10^7 | 1.48×10^{-2} | 1.65×10^{-10} |
| 2-78 - C2G4 | 2.10×10^8 | 7.82×10^{-3} | 3.72×10^{-11} |

Пример 4. FACS-анализ связывания анти-MSLN антитела с MSLN-экспрессирующей раковой клеткой.

Для того, чтобы оценить, связывается ли селективно анти-MSLN антитело, полученное из иммунной и синтетической библиотеки, с MSLN-экспрессирующей клеткой, количество экспрессии MSLN было определено в линии раковых клеток, и каждое связывание антитела с клеткой было подтверждено FACS-тестом.

4-1. Создание MSLN-экспрессирующей клеточной линии.

Плазмиду (pCMV/MSLN), содержащую MSLN экспрессирующую часть и ген устойчивости к гиромоцину, доставили в клетку рака поджелудочной железы MiaPaCa-2 (верифицированную как MSLN-отрицательная линия клеток) при помощи системы трансфекции jetPEI (полиэтиленимин) (Polyplus, 101-40) (фиг. 4). Через 48 ч культуральную жидкость заменили культуральной жидкостью, содержащей гиромоцин В (200 мкг/мл). Было получено 10 колоний, обладающих резистентностью к гиромоцину, при этом культуральную жидкость меняли каждые 3 дня, чтобы в каждом случае подтвердить количество MSLN-экспрессии методом Вестерн-блоттинга. В отношении четырех видов клеточных линий рака поджелудочной железы (MiaPaCa-2, ВхРС-3, Сарап-1, AsPC-1) и двух видов клеточных линий мезотелиомы (H28, H2452) количество MSLN-экспрессии было подтверждено путем использования анти-MSLN антитела (# 133489, Abcam) и метода Вестерн-блоттинга. Культивируемые клетки отделили добавлением раствора Tryple Express и хранили в пробирке 15 мл с последующим центрифугированием при 2000 об/мин при комнатной температуре в течение 3 мин, чтобы отбросить культуральную жидкость, и полученный продукт суспендировали с 100 мкл 1×SDS-PAGE буфера для образца (50 mM Tris(pH6.8), 2% SDS, 100 mM DTT (дителиотреитол), 0.1% BPB (бромфеноловый синий), 10% глицерин) и нагревали в течение 5 мин. Полученный продукт центрифугировали, чтобы собрать супернатант, а затем проводили электрофорез в 4-12% SDS-PAGE, при 20 mA в течение примерно 2 ч. Чтобы перенести отделенный белок на мембрану PVDF, использовали устройство для переноса, а затем проводили электрофорез при 300 mA трис-глициновым буфером (39 mM глицин, 48 mM трис, 0.037% SDS, 20% метанол) в течение примерно 90 мин. Мембрану PVDF, на которую был перенесен белок, блокировали при комнатной температуре в течение 1 ч, используя TBS-блокирующий раствор. Анти-MSLN антитело (# 133489, Abcam) в качестве первичного антитела разбавили 1:2000 5% обезжиренное молоко/1×TBST буфер, и дали прореагировать при комнатной температуре в течение примерно 1 ч и промыли буфером 1×TBST 6 раз каждые 5 мин. Антимышь HRP (KPL, MA, США) как вторичное антитело разбавили 1:20000 5% обезжиренное молоко/1×TBST буфер, дали прореагировать в течение 30 мин и промыли 1×TBST буфером 6 раз каждые 5 мин. Затем полосу MSLN белка верифицировали по появлению окрашивания реакционного раствора (ECL, Amersham, UK).

В результате, как показано на фиг. 5, было подтверждено, что клеточные линии H28, MiaPaCa-2, ВхРС-3, Сарап-1 являются MSLN-отрицательными, и H226, H2452(H2052), AsPC-1 являются MSLN-положительными независимо от наличия MSLN в форме предшественника 70 kDa и в зрелой форме от 40 до 50 kDa из каждой линии раковых клеток.

4-2. Анализ количества MSLN-экспрессии в MSLN-экспрессирующих клеточных линиях и MSLN-экспрессирующих линиях опухолевых клеток.

Тест FACS был проведен на MSLN, присутствующем на клеточной поверхности, в отношении MiaPaCa-MSLN, представляющую собой клеточную линию, в которой MSLN был искусственно экспрессирован. Для проведения анализа клетки, выращенные в культуральной чашке, отделили добавлением раствора Tryple Express и хранили в пробирке 50 мл, а затем центрифугировали при 2000 об/мин при комнатной температуре в течение 3 мин, слили культуральную жидкость, и полученный продукт один раз промыли PBS. Клетки суспендировали с FACS буфером и перенесли в круглодонную пробирку и центрифугировали при 2000 об/мин при комнатной температуре в течение 3 мин. Супернатант отбросили, а клетки диспергировали, используя FACS буфер, так чтобы получить плотность клеток 4×10^5 /мл. Затем добавили 1 мкг кандидатного антитела при 4°C. Через 1 ч полученный материал дважды промыли FACS буфером, и козы античеловек IgG антитела (конъюгированные с FITC) добавили в количестве 1 мкл для каждого образца, которые объединялись при 4°C в течение 30 мин. Клетки собрали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 3 мин и добавили 500 мкл фиксирующего буфера, чтобы ресуспендировать клетки, затем клетки анализировали с помощью FACS Calibur (фиг. 6).

4-3. Анализ селективного связывания анти-MSLN антитела с MSLN-экспрессирующей линией клеток.

Для того, чтобы оценить, наблюдалось ли селективное связывание анти-MSLN антитела с MSLN-сверхэкспрессирующей линией клеток (MiaPaCa-MSLN #2), был проведен тест FACS. Анти-MSLN кандидатное антитело было помечено с помощью метода, описанного в примере 4-2 выше, и клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (фиг. 7).

Тест FACS был проведен с целью оценки, связывались ли эффективно кандидатные антитела MI323, MI329, MI403 и MS502, обладающие очень хорошей силой связывания, с MSLN клеточной линии мезотелиомы (H226, H2052) и рака поджелудочной железы (AsPC-1), и результаты сравнивали со значениями MFI.

Таблица 19

| MSLN Ab | MiaPaCa2 | H226 | ASPC-1 | H2052 |
|------------|----------|------|--------|-------|
| MSLN test | — | + | + | ++ |
| MS502 | — | ++ | ++ | ++ |
| MI403 | — | + | ++ | ++ |
| MI323 | — | +++ | ++ | ++ |
| MI329 | — | +++ | ++ | ++ |
| Morab | — | +++ | ++ | ++ |
| BAY94-9343 | — | +++ | ++ | ++ |

В результате, как показано на фиг. 8 и в табл. 19, все MI323, MI329, MI403 и MS502 кандидатные антитела обладали значительной силой связывания с MSLN линий раковых клеток мезотелиомы и поджелудочной железы, даже несмотря на существование небольшого различия в степени связывания. В частности, MI323 кандидатное антитело демонстрирует отличное связывание.

Далее, связывались ли селективно MI323 кандидатное антитело, обладающее отличным связыванием с MSLN, MS502 кандидатное антитело, имеющее другой паттерн значения $K_D(K_{off}/K_{on})$ Вiasoge, и кандидатное антитело с мутацией варибельной области тяжелой цепи 2-78-C2G4, полученное из MS502 кандидатного антитела, с MSLN-экспрессирующими опухолевыми клетками оценивали в MiaPaCa-MSLN #2 клетке, которая сверхэкспрессирует MSLN, и клетке MiaPaCa-2, которая не сверхэкспрессирует MSLN.

В результате, как показано на фиг. 9, MI323, MS502 и 2-78-C2G4 кандидатные антитела продемонстрировали отличное связывание в MSLN-сверхэкспрессирующей MiaPaCa-MSLN #2 клетке по сравнению с MiaPaCa-2.

Промышленная применимость

Антитело, специфически связывающееся с мезотелином согласно настоящему изобретению, обладает высокой аффинностью и специфичностью к антигену, поэтому может быть пригодно для эффективного использования при лечении или диагностике раковых или опухолевых заболеваний.

Настоящее изобретение подробно описано на основе его частных случаев, при этом специалистам в данной области техники понятно, что эти специфические технологии являются только предпочтительными вариантами осуществления, и поэтому объем настоящего изобретения не ограничивается данными вариантами осуществления. По этой причине действительные границы объема настоящего изобретения будут определяться прилагаемыми пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, связывающееся с мезотелином, содержащее

CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, варибельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

2. Антитело, связывающееся с мезотелином, содержащее

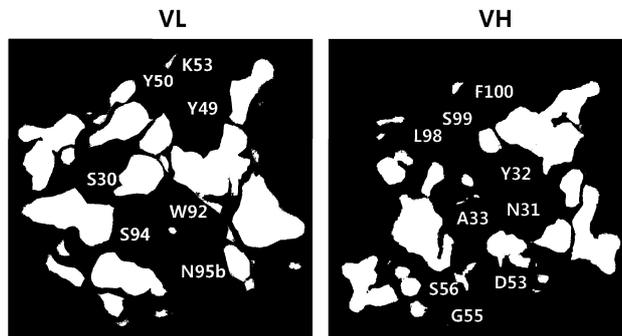
варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, варибельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

3. Антитело, связывающееся с мезотелином, содержащее варибельную область легкой цепи, содержащую CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, где антитело дополнительно содержит

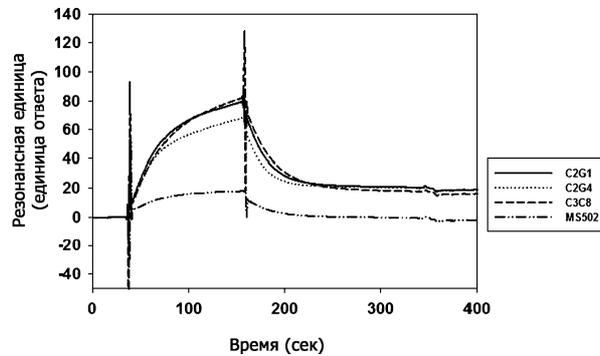
варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, в указанной варибельной области легкой цепи, или

варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

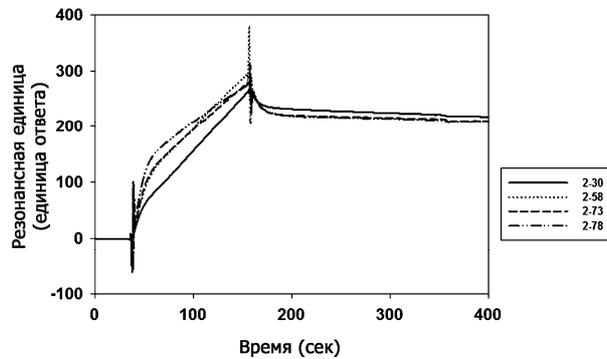
- 116, вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110.
17. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п.1.
 18. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п.2.
 19. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п.3.
 20. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п.4.
 21. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.17.
 22. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.18.
 23. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.19.
 24. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.20.
 25. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.21-24.
 26. Способ получения антитела по любому из пп.1-4, включающий экспрессию антитела культивируемой клеткой-хозяином по п.25.
 27. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая антитело по любому из пп.1-4 в качестве активного ингредиента.



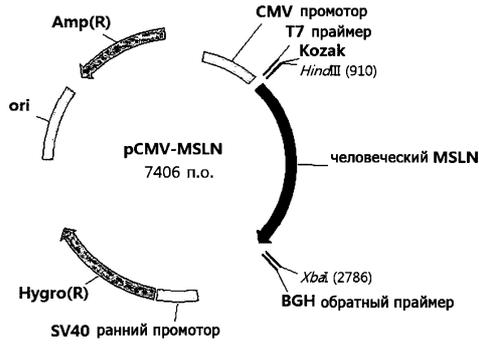
Фиг. 1



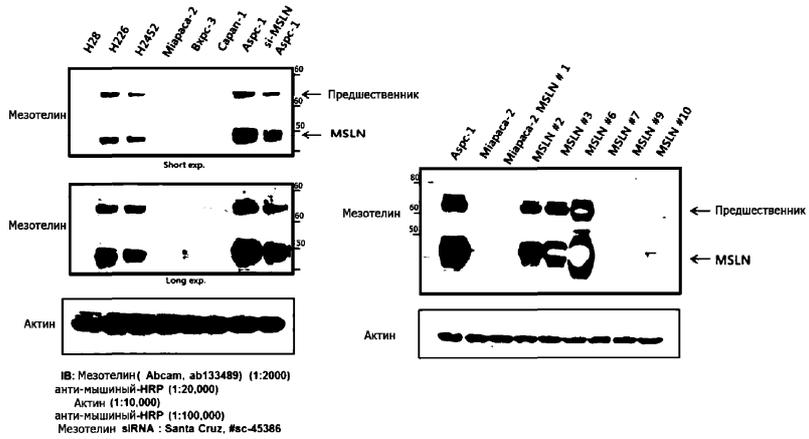
Фиг. 2



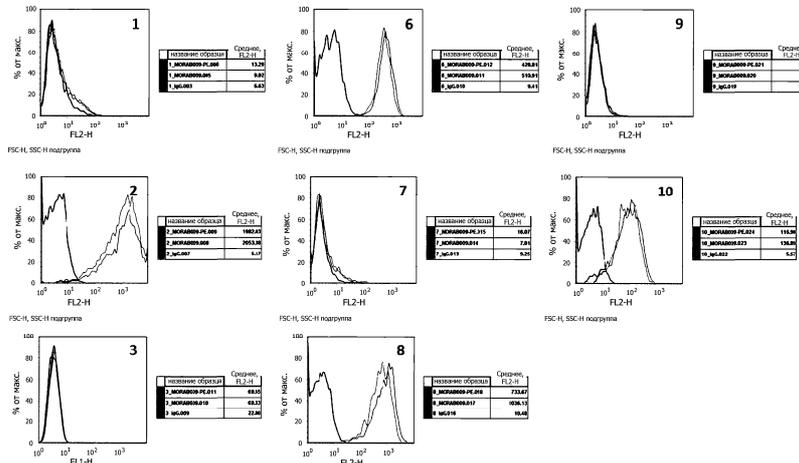
Фиг. 3



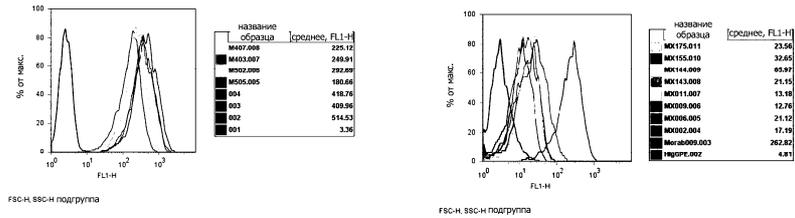
Фиг. 4



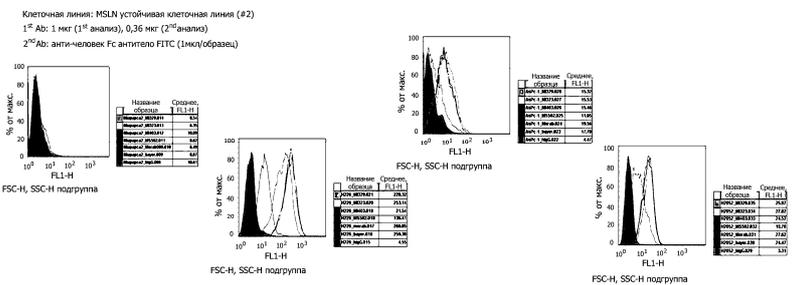
Фиг. 5



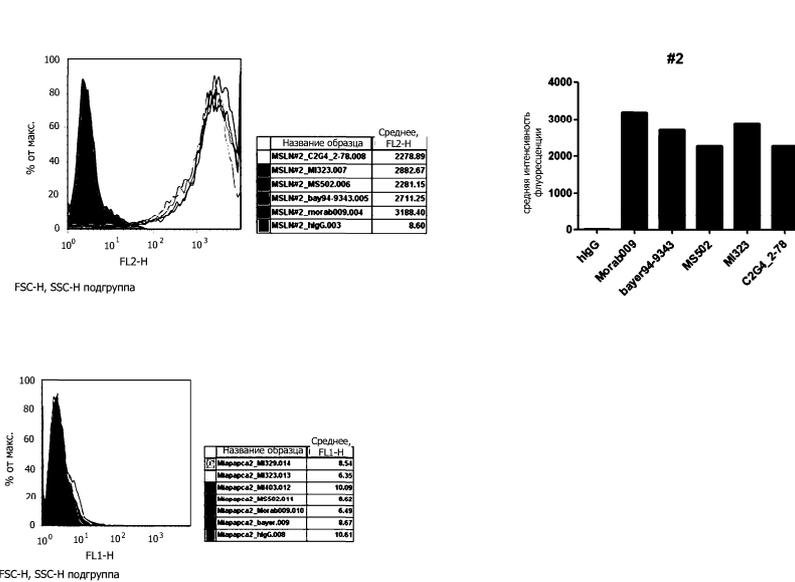
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9