

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039434

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.27

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891499

(22) Дата подачи заявки
2017.02.10

(54) ХИМЕРНОЕ СОБАЧЬЕ АНТИ-CD20 АНТИТЕЛО

(31) 62/296,729

(56) WO-A1-2016016859
WO-A1-2013054127

(32) 2016.02.18

(33) US

(43) 2019.01.31

(86) PCT/US2017/017337

(87) WO 2017/142800 2017.08.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛАНКО ЮЭС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Панкук Джеймс Дэвид (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Гизатуллина Е.М.,
Глухарёва А.О., Христофоров А.А.,
Лыу Т.Н. (RU)

(57) Данное изобретение относится к канинизированным химерным антителам анти-CD20 против белка CD20 собаки и способам их использования для лечения определенных заболеваний, таких как неходжкинская В-клеточная лимфома у собак.

039434 B1

039434 B1

039434

B1

Перечень последовательностей

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Упомянутая копия ASCII, созданная 10 февраля 2016 г., называется "перечнем последовательностей P20914" и имеет размер 14 КБ.

Данное изобретение относится к канинизированным химерным антителам анти-CD20 против белка CD20 собаки и способам их использования для лечения определенных заболеваний, таких как неходжкинская В-клеточная лимфома у собак.

Данное изобретение относится к области лечения рака.

Лимфомы у собак представляют собой группу различных видов рака и являются одними из наиболее распространенных раковых патологий, диагностируемых у собак. Они в совокупности составляют приблизительно 7-14% всех случаев рака, диагностируемых у собак. Существует более 30 описанных типов лимфомы у собак, и эти виды рака сильно варьируются по течению. Для некоторых видов рака характерно быстрое прогрессирование и в случае отсутствия лечения они остро угрожают жизни, в то время как другие виды рака развиваются очень медленно и протекают как хронические, медленно прогрессирующие заболевания. Лимфомы могут поражать любой орган в организме, но чаще всего возникают в лимфатических узлах, прежде чем распространиться в другие органы, такие как селезенка, печень и костный мозг.

CD20 представляет собой белок клеточной поверхности с четырьмя спиральными трансмембранными областями. Молекула CD20 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки В-клеток. Антиген CD20 присутствует исключительно на поверхности почти всех В-клеток, как непораженных раком, так и злокачественных.

Ритуксимаб представляет собой химерное моноклональное антитело против белка CD20 человека, который в основном находится на поверхности В-клеток иммунной системы. Ритуксимаб разрушает В-клетки и поэтому применяется для лечения заболеваний у людей, которые характеризуются чрезмерным количеством В-клеток, сверхактивных В-клеток или дисфункциональных В-клеток. Эти заболевания включают в себя многие лимфомы, лейкозы, отторжение трансплантата и аутоиммунные нарушения.

Ритуксимаб разрушает как непораженные, так и злокачественные В-клетки человека, которые имеют CD20 на своих поверхностях. Эффект приводит к элиминации В-клеток (включая раковые) из организма, что позволяет создать новую популяцию здоровых В-клеток из лимфоидных стволовых клеток.

К сожалению, излечение собак с лимфомами по-прежнему остается труднодостижимым, поэтому существует потребность в дополнительных и новых методах терапии, которые могут оказаться эффективными при их лечении.

K9LO-133 представляет собой химерное антитело против CD20, которое нацелено на зрелые В-лимфоциты у собак. K9LO-133 связывается с CD20 на В-лимфоцитах собаки. K9LO-133 является потенциально пригодным для лечения неходжкинской В-клеточной лимфомы и других типов лимфомы у собак.

Соответственно в данном изобретении предлагается антитело, которое специфически связывается с собачьим CD20. В данном изобретении также предлагается способ лечения лимфомы у пациента-собаки путем введения пациенту-собаке со злокачественной лимфомой, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела, которое специфически связывается с CD20 собаки. В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая антитело, которое специфически связывается с CD20 собаки, и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. В данном изобретении также предлагается антитело, которое специфически связывается с CD20 собаки, а также связывается с белком А.

Краткое описание графических материалов

На фигуре проиллюстрированы уровни В-лимфоцитов CD21+ и CD22+ и Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+ в сыворотке от 5 до 37 дня у собак, получавших антитело K9LO-133.

Подробное описание

Если не указано иное, термин "антитело" (Ат) относится к молекуле иммуноглобулина, содержащей две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), связанные между собой дисульфидными связями. Аминотерминальная часть каждой цепи включает в себя вариабельный участок от около 100 до около 110 аминокислот, в основном ответственный за распознавание антигена через определяющие комплементарность области (CDR), содержащиеся в нем. С-концевая часть каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию.

В данном контексте термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к любому фрагменту антитела, который сохраняет способность связываться с его антигеном. Такие "антигенсвязывающие фрагменты" могут быть выбраны из группы, состоящей из фрагментов Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc и диател. Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере одну вариабельную область. Предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR). Более предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент в данном контексте включает HCVR и LCVR и обеспечивает антигенсвязывающую

специфичность к CD20 собаки (т.е. "фрагмент, связывающий CD собаки").

В данном контексте термины "определяющая комплементарность область" и "CDR" относятся к несмежным антигенсвязывающим центрам, находящимся в варибельной области полипептидов LC и HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Эти конкретные области были описаны другими авторами, включая Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat et al.: Последовательности протеинов иммунологического интереса, пятое издание, Департамент здравоохранения и социальных служб США, публикация NIH № 91-3242 (1991); Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); и North et al., *J. Mol. Biol.*, 406, 228-256 (2011), где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом.

В данном контексте термин "варибельная область легкой цепи" относится к части LC молекулы антитела, которая включает в себя аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR, т.е. LCDR1, LCDR2 и LCDR3), и каркасных областей легкой цепи (LFRW).

В данном контексте термин "варибельная область тяжелой цепи (HCVR)" относится к части HC молекулы антитела, которая включает в себя аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR, т.е. HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и каркасных областей тяжелой цепи (HFRW).

CDR чередуются с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями ("FRW"). Каждая LCVR и HCVR состоит из трех CDR и четырех FRW, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FRW1, CDR1, FRW2, CDR2, FRW3, CDR3, FRW4. Три CDR легкой цепи обозначаются как "LCDR1, LCDR2 и LCDR3", а три CDR HC обозначаются как "HCDR1, HCDR2 и HCDR3". CDR содержат большую часть остатков, которые формируют специфические взаимодействия с антигеном.

Нумерация и позиционирование аминокислотных остатков CDR в областях LCVR и HCVR соответствует известным конвенциям (например, Кабат (1991), Чотиа (1987) и/или Норс (2011)). В различных вариантах осуществления данного изобретения FRW антитела могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным путем или искусственно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 Ат для способов и/или использований данного изобретения изменяется для увеличения или уменьшения степени, до которой указанное антитело является гликозилированным. Добавление или удаление участков гликозилирования в антитело может быть с легкостью осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности, в результате чего создается или удаляется один или большее количество участков гликозилирования.

Если не указано иное, когда аминокислотный остаток в антителе обозначается с помощью числа, в данном документе применяется система нумерации ЕС, поскольку она является общепринятой для использования в данной области техники (см. Kabat et al.: Последовательности протеинов иммунологического интереса, пятое издание, Департамент здравоохранения и социальных служб США, публикация NIH № 91-3242 (1991)).

В данном контексте термин "набор" относится к упаковке, содержащей по меньшей мере два отдельных контейнера, при этом первый контейнер содержит K9LO-133 Ат, а второй контейнер содержит фармацевтически приемлемые носители, разбавители или вспомогательные вещества. В данном контексте термин "набор" также относится к упаковке, содержащей по меньшей мере два отдельных контейнера, при этом первый контейнер содержит K9LO-133 Ат и другое антитело, которое является предпочтительным для лечения раковых опухолей, не относящихся к лимфомам. "Набор" может также включать в себя инструкции по введению всего или части содержимого этих первого и второго контейнеров пациенту с раком. Необязательно эти наборы также включают в себя третий контейнер, содержащий композицию, содержащую известный химиотерапевтический агент.

В данном контексте термин "лечение", "лечить" или "воздействие" относится к сдерживанию, замедлению, приостановке, уменьшению или обратному развитию прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологического состояния или заболевания.

В данном контексте термин "эффективное количество" относится к количеству, или дозе, канинизированного анти-CD20 Ат, которое при однократном или множественном введении пациенту обеспечивает эффективный ответ у пациента при диагностике или лечении.

В данном контексте термины "эффективный ответ" пациента, или "восприимчивость" пациента к лечению комбинацией агентов, или "терапевтический эффект" относятся к клиническому или терапевтическому эффекту(ам), наблюдаемому(ым) у пациента при введении канинизированного анти-CD20 Ат. Такой эффект(ы) включает(ют) в себя любой один или большее количество из параметров: продление выживаемости (включая общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования); получение ответившего ответа (включая полный ответ или частичный ответ); уменьшение количества В-клеток, уменьшение концентрации В-клеток в крови или других тканях и жидкостях пациента, регрессия опухоли, уменьшение веса или размера опухоли, более длительный период до прогрессирования заболевания, увеличение продолжительности выживаемости, более длительная выживаемость без прогрессирования, повышение частоты общего ответа, увеличение продолжительности ответа и улучшение качества жизни.

и/или ослабление признаков или симптомов рака и т.д.

Эффективное количество может быть легко определено врачом-диагностом, представляющим собой специалиста в данной области техники, с помощью известных методов и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента врач-диагност оценивает ряд факторов, включая, но не ограничиваясь этим, вид или породу пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; наблюдаемое специфическое заболевание или нарушение; степень или вовлечение, или тяжесть заболевания или нарушения; ответ отдельного пациента; определенное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему введения; использование сопутствующих лекарственных препаратов; и другие соответствующие обстоятельства.

K9LO-133.

AME-133V представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 второго поколения. K9LO-133 представляет собой частично канинизированный (вариабельные области человека с константными областями собак) вариант изотипа С моноклонального антитела AME-133V, который специфически связывается с белком CD20 у собак.

В одном варианте осуществления данного изобретения K9LO-133 содержит модифицированные вариабельные области тяжелых и легких цепей, CDR и каркасов. В одном варианте осуществления данного изобретения вводят вариант остатка в LCDR1 K9LO-133. В одном варианте осуществления данного изобретения вариант остатка в LCDR1 K9LO-133 представляет собой V165G. В одном варианте осуществления данного изобретения вводят вариантную шарнирную область. В одном варианте осуществления данного изобретения добавляют вариантную область по ходу транскрипции от шарнира. В одном варианте осуществления вариантная область по ходу транскрипции от шарнира позволяет K9LO-133 связываться с белком А.

K9LO-133 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, соответствующую SEQ ID NO: 1, и соответствующую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, которая кодирует аминокислоту SEQ ID NO: 1. K9LO-133 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3. Область вариабельной последовательности тяжелой цепи дополнительно состоит из HFWK 1 (SEQ ID NO: 4), HCDR1 (SEQ ID NO: 5), HFWK 2 (SEQ ID NO: 6), HCDR2 (SEQ ID NO: 7), HFWK3 (SEQ ID NO: 8) и HCDR3 (SEQ ID NO: 9).

K9LO-133 имеет аминокислотную последовательность легкой цепи, соответствующую SEQ ID NO: 10, и соответствующую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, которая кодирует аминокислоту SEQ ID NO: 10. K9LO-133 имеет последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12. Область вариабельной последовательности легкой цепи дополнительно состоит из LFWK 1 (SEQ ID NO: 13), LCDR1 (SEQ ID NO: 14), LFWK 2 (SEQ ID NO: 15), LCDR2 (SEQ ID NO: 16), LFWK 3 (SEQ ID NO: 17), LCDR3 (SEQ ID NO: 18) и области J (SEQ ID NO: 19).

Экспрессия CD20 в ткани лимфомы собак.

Экспрессия CD20 в ткани лимфомы собак может быть оценена с помощью иммуногистохимии (ИГХ) с AME-133V и K9LO-133. С целью обнаружения связывания AME-133V и K9LO-133 могут быть нанесены для криосрезы образцов лимфомы собак в одной концентрации, например 10 мкг/мл. Кроме того, AME-133V и K9LO-133 могут быть заменены подходящим видом и изотипом соответствующего антитела отрицательного контроля, которое имеет антигенную специфичность, отличающуюся от антигенной специфичности детекторных антител, например либо IgG1 человека, обозначаемого как ЧелIgG1 (для AME-133V), либо IgG собаки, обозначаемого как СобIgG (для K9LO-133). Другие контроли могут быть получены путем исключения из анализа детекторных антител или антител отрицательного контроля (контроль анализа).

При анализе, как описано выше, AME-133V и K9LO-133 продуцировали 3+ окрашивание >75% мононуклеарных лейкоцитов положительного контроля. В случае с K9LO-133 окрашивание 3+ наблюдали в лимфоцитах в белой пульпе селезенки собаки. AME-133V и K9LO-133 специфически не реагировали с гладкими миоцитами отрицательного контроля (в частности, с ядрами в случае с K9LO-133) в селезенке собаки. Антитела отрицательного контроля ЧелIgG1 и СобIgG специфически не реагировали с элементами ткани селезенки собаки ни положительного, ни отрицательного контроля. Также не наблюдали окрашивания контрольных срезов. Специфические реакции AME-133V и K9LO-133 с элементом ткани положительного контроля и отсутствие специфической реактивности с элементом ткани отрицательного контроля, а также отсутствие реактивности антитела отрицательного контроля свидетельствовали о том, что анализ был чувствительным, специфичным и воспроизводимым. CD20 был обнаружен в >75% неопластических клеток в 8 из 10 исследованных образцов лимфомы собак. В других образцах 1-5% неопластических клеток были положительно окрашены на CD20.

Собаки, получавшие K9LO-133.

Доза Ритуксимаба, применяемая у человека для лечения неходжкинской лимфомы, составляет 375 мг/м². Как правило, химиотерапевтическая доза для собак составляет 40% от дозы человека, независимо от типа рака. Поэтому, не ограничиваясь теорией, подходящая начальная доза антитела анти-CD20 для собак при неходжкинской лимфоме составляет около 150 мг/м². С целью определения дозы относи-

тельно площади поверхности тела собаки весом 7 кг количество 150 мг/м² было скорректировано путем умножения на 0,37. Полученная доза K9LO-133, вводимая собакам, составляла около 57 мг/собаку.

В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 140 до около 160 мг/м² площади поверхности тела.

В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 130 до около 170 мг/м² площади поверхности тела. В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 110 до около 190 мг/м² площади поверхности тела. В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 50 до около 250 мг/м² площади поверхности тела.

В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 50 до около 60 мг/собаку. В другом варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 40 до около 70 мг/собаку. В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 30 до около 100 мг/собаку. В одном варианте осуществления данного изобретения доза K9LO-133, вводимая собаке, составляет от около 10 до около 1000 мг/собаку.

Эффективность K9LO-133 определяли у собак путем внутривенного (в/в) введения им указанного антитела в дозе около 150 мг/м² в дни 0, 7 и 35. Три собаки женского пола породы бигль акклиматизировали к условиям исследования в течение 7 дней, на протяжении которых они подвергались физическим обследованиям, измерениям веса тела и ежедневным клиническим наблюдениям. В дни введения собаки получали 57 мг K9LO-133 посредством медленной в/в инфузии со скоростью 0,5-1 мл/мин.

Кровь собирали для определения пропорций лимфоцитов и сохраняли сыворотки в дни 2, 5, 9, 16, 23, 30 и 37.

Как изображено на фигуре, было отмечено снижение доли В-лимфоцитов крови после лечения с использованием K9LO-133. Доля В-лимфоцитов (CD21+ и CD22+) снизилась на день 2, продемонстрировала восстановление между днями 2 и 30, но до дня 37 еще не вернулась к исходным уровням. CD8+ Т-лимфоциты продемонстрировали снижение на день 16, но ко дню 23 вернулись к исходным уровням. Доля CD4+ Т-лимфоцитов оставалась относительно постоянной.

Таким образом, в/в введение K9LO-133 уменьшало количество В-лимфоцитов в циркулирующей крови с временным снижением CD8+ Т-лимфоцитов у пролеченных собак.

В одном аспекте, описанном в данном документе, предлагается антитело, имеющее вариабельную область легкой цепи (LCVR), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 12, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело специфически связывается с CD20 собаки.

В другом аспекте, описанном в данном документе, предлагается антитело, имеющее легкую цепь (LC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь (HC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело специфически связывается с CD20 собаки.

В одном аспекте, описанном в данном документе, предлагается антитело, имеющее две легкие цепи (LC), каждая из которых имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, и две тяжелые цепи (HC), каждая из которых имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело специфически связывается с CD20 собаки.

В другом аспекте предлагается способ лечения лимфомы у пациента-собаки, который включает в себя введение пациенту-собаке со злокачественной лимфомой, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела, имеющего вариабельную область легкой цепи (LCVR), аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 12, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 3, при этом указанное антитело специфически связывается с CD20 собаки. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело имеет легкую цепь (LC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь (HC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления данного изобретения антитело представляет собой K9LO-133.

В одном аспекте предлагается набор, который содержит фармацевтическую композицию, содержащую K9LO-133, с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

В другом аспекте предлагается антитело, имеющее легкую цепь (LC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь (HC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 1, при этом указанное антитело специфически связывается с CD20 собаки и указанное антитело связывается с белком А.

Примеры

K9LO-133.

K9LO-133 может поставляться в 10 mM цитрата, 150 mM NaCl, pH 6,5 в концентрации 26,3 мг/мл.

Носителем может быть физиологический солевой раствор с концентрацией 0,9% NaCl.

Расчет вводимой дозы K9LO-133 может быть основан на площади поверхности тела, которая была рассчитана для собак в этом исследовании как 0,37 м². Каждая собака получала 150 мг/м² (57 мг) K9LO-133 в каждой дозе. Дозы готовили путем отбора 57 мг (2,2 мл) K9LO-133 и разведения в 27,8 мл физиологического солевого раствора, чтобы довести общий объем до 30 мл для инфузии.

Проточная цитометрия.

Количество Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+) и В-лимфоцитов (CD21+ и CD22+) может быть определено с помощью проточной цитометрии. Сбор крови для проточной цитометрии выполняли до кормления. Около 1 мл крови, антикоагулированной ЭДТК, получали от 3 собак на исходном уровне (день -5) и в дни 2, 9, 16, 23, 30 и 37. Эритроциты лизировали гипотоническим буфером хлорида аммония, а лейкоциты окрашивали антителами, реагирующими с CD4, CD8, CD21 и CD22 собаки. Затем удаляли несвязанные антитела и получали 10000 лейкоцитарных объектов в проточном цитометре FACScan или FACSAria.

Образцы лимфомы.

Десять замороженных образцов лимфомы собак иссекали, помещали в состав Tissue-Tek® OCT (оптимальная температура иссечения) и хранили в морозильной камере для поддержания -80°C до приготовления срезов. Срезы готовили толщиной около 5 мкм, чтобы получить соответствующее количество микропрепаратов для последующего окрашивания ИГХ.

Иммуногистохимическое окрашивание.

Срезы из каждого образца лимфомы окрашивали с использованием АМЕ-133V, моноклонального антитела IgG1, направленного против человеческого CD20 человека, и K9LO-133, изотипа С химерного моноклонального антитела собаки, направленного против CD20 собаки, с помощью ИГХ, как подробно описано ниже. АМЕ-133V находилось в растворе 19,5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4. K9LO-133 находилось в растворе 2,5 мг/мл в ФСБ, pH 7,4.

Окрашивание ИГХ проводили, включая использование материалов положительного и отрицательного контроля на каждом этапе окрашивания и использование дополнительных микропрепаратов для антитела отрицательного контроля и контроля анализа с целью обеспечения специфичности окрашивания. Процедуры окрашивания, разведения первичных и вторичных антител и контрольные образцы для АМЕ-133V проверяли на соответствие требованиям на этапах предварительного окрашивания. Процедуры окрашивания, разведения первичных и вторичных антител и контрольные образцы для K9LO-133 проверяли на соответствие требованиям в ходе осуществления способа окрашивания.

Окрашивание АМЕ-133V.

Процедуру непрямого иммунопероксидазного окрашивания можно использовать для окрашивания ткани лимфомы собак с использованием АМЕ-133V с целью обнаружения CD20. Микропрепараты фиксировали в ацетоне в течение 10 мин при комнатной температуре во время секционирования. Криосрезы, фиксированные в ацетоне, дважды промывали в фосфатно-солевом буферном растворе, 0,15 M NaCl, pH 7,2 ФСБ. Затем эндогенную пероксидазу гасили путем инкубации микропрепаратов с использованием Bioscience Resource Abolish в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем микропрепараты дважды промывали ФСБ, инкубировали с авидиновым раствором в течение 15 мин, промывали один раз ФСБ, инкубировали с раствором биотина в течение 15 мин и промывали один раз ФСБ. Затем в течение 20 мин микропрепараты обрабатывали белковым блоком, предназначенным для уменьшения неспецифического связывания. Белковый блок готовили следующим образом: ФСБ+1%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА), 0,5%-ный казеин и 3%-ная сыворотка ослы.

После белкового блока первичные антитела АМЕ-133V, IgG1 человека или ни одно из них наносили на микропрепарат в концентрации 10 мкг/мл на 1 ч. Затем микропрепараты дважды промывали ФСБ и наносили на микропрепараты биотинилированное вторичное антитело (ослиный анти-человеческий IgG) на 30 мин. Затем микропрепараты дважды промывали ФСБ, оставляли для реакции на 30 мин с реагентом ABC Elite и дважды промывали ФСБ. Затем DAB наносили в течение 4 мин в качестве субстрата для пероксидазной реакции. Все микропрепараты промывали водопроводной водой, контрастно окрашивали, обезжировали и фиксировали. ФСБ+1% БСА применялись в качестве разбавителя для первичных антител и реагента ABC Elite. (ФСБ+1%-ный БСА)+IgG собаки (разбавление 1:25) применялись в качестве разбавителя для вторичного антитела.

Окрашивание K9LO-133.

Процедуру непрямого иммунопероксидазного окрашивания можно использовать для окрашивания ткани лимфомы собак с использованием K9LO-133 с целью обнаружения CD20. Необходимость мечения (например, биотином, пероксидазой или флуоресцеином) K9LO-133 и неспецифическую реактивность между вторичным меченым анти-собачьим IgG и IgG, эндогенным к исследуемым тканям, можно устранить в соответствии со следующим процессом. Меченому вторичному антителу давали возможность специфически прикрепиться к немеченому первичному антителу (K9LO-133, СобIgG или ни одному) путем инкубации в течение ночи смесей первичного/вторичного антител перед нанесением на криосрезы ткани. Детекторный реагент или антитело отрицательного контроля (в концентрации 10 мкг/мл) смешивали с биотинилированным кроличьим антисобачьим IgG, антителом, специфическим к Fc-фрагменту

(Rb α Co β IgG), в концентрации 15 мкг/мл для достижения соотношения первичного и вторичного антитела 1:1,5 в день перед окрашиванием.

Предварительно комплексированные антитела инкубировали в течение ночи на качающемся механизме в холодильнике, установленном на поддержание температуры 4°C. Перед использованием антитела в последующий день в каждый флакон добавляли гамма-глобулины собаки для достижения конечной концентрации 3 мг/мл, а затем инкубировали в течение по меньшей мере 2 ч на качающемся механизме в холодильнике, установленном на поддержание температуры 4°C. Микропрепараты фиксировали в ацетоне в течение 10 мин при комнатной температуре во время секционирования. В день окрашивания микропрепараты дважды промывали трис-буферным солевым раствором, 0,15 M NaCl, pH 7,6 ТБС. Затем эндогенную пероксидазу гасили путем инкубации микропрепаратов с использованием соответствующего реагента, такого как реагент Bioscage PeroxAbolish, в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем микропрепараты дважды промывали ТБС, инкубировали с авидиновым раствором в течение 15 мин, промывали один раз ТБС, инкубировали с раствором биотина в течение 15 мин и промывали один раз ТБС. Затем в течение 20 мин микропрепараты обрабатывали белковым блоком, предназначенным для уменьшения неспецифического связывания.

Белковый блок готовили следующим образом: ТБС+1%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА), 0,5%-ный казеин и 3%-ная нормальная сыворотка кролика. После белкового блока предварительно комплексированные первичные и вторичные антитела наносили на микропрепараты на 2 ч. Затем микропрепараты дважды промывали ТБС, обрабатывали реагентом ABC Elite в течение 30 мин, дважды промывали ТБС и затем обрабатывали DAB в течение 4 мин в качестве субстрата для пероксидазной реакции. Все микропрепараты промывали водопроводной водой, контрастно окрашивали, обезвоживали и фиксировали. ТБС+1%-ный БСА применялись в качестве разбавителя для всех антител и реагента ABC. Каждый этап окрашивания включал положительный контроль (моноклеарные лейкоциты) и отрицательный контроль (миоциты гладких мышц) криосрезов селезенки собаки.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1; PRT; Искусственная последовательность

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLT
 GDTSYNQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARSTYVGGDWQFDVWGKG
 TTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVSGYIPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFSPV
 LQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSSETFTCNVAHPATNTKVDKPVPKRENGRVP RPDPCKCPAP
 ELLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPENPEVQISWFDVSKQVQTANTQPREEQ

SNGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLPSPRDE
 MSKNTVTLTCLVKDFPPEIDVEWQSNQQEPESKYRMTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
 WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSPGK

SEQ ID NO: 2; ДНК; Искусственная последовательность

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTG
 AAGATCTCCIGIAAGGGTCTTGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCAC'TGGGTGCG
 CCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGAT
 ACTTCCTACAATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAG
 CACCGCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTG
 CGAGATCGACTTACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCAC
 GGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCACGGCCCCCTCGGTTTTCCCGCTAGCGCCCAGCT
 GTGGGTCCCAATCCGGCTCCACGGTGGCCCTGGCCTGCCTGGTGTGACGGCTACATCCCC
 GAGCCTGTAAGTGTCTCGAATTCCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTGCACACCTTCCC
 GTCCGTCTGCAGTCCTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACAGTGGCCTCCA
 GCAGGTGGCCCAGCGAGACCTTCACCTGCAATGTGGCCCCACCCGGCCACCAACACTAA
 AGTAGACAAGCCAGTGCCCAAAAGAGAAAATGGAAGAGTTCCTCGCCACCTGATTGT
 CCCAAATGCCAGCCCCCTGAACTGCTGGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCAAA
 ACCCAAGGACACCCTCTTGATTGCCCGAACACCTGAGGTCACATGTGTGGTGGTGGATC
 TGGACCCAGAAAACCCTGAGGTGCAGATCAGCTGGTTCGTGGATAGTAAGCAGGTGCA
 AACAGCCAACACGCAGCCTCGTGAGGAGCAGTCCAATGGCACCTACCGTGTGGTCAGT
 GTCTTCCCCATTGGGCACCAGGACTGGCTTTCAGGGAAGCAGTTCAAGTGCAAAGTCA
 ACAACAAAGCCCTCCCATCCCCATTGAGGAGATCATCTCCAAGACCCAGGGCAGGC
 CCATCAGCCTAATGTGTATGTCTGCCGCCATCGCGGGATGAGATGAGCAAGAATACG
 GTCACCCTGACCTGTCTGGTCAAAGACTTCTTCCCACCTGAGATTGATGTGGAGTGGCA
 GAGCAATGGACAGCAGGAGCCTGAGAGCAAGTACCGCATGACCCCGCCCCAGCTGGAT
 GAAGATGGGTCTACTTCCTATACAGCAAGCTCTCCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGC
 GGGGAGACACCTTCATATGTGCGGTGATGCATGAAGCTCTACACAACCACTACACACA
 GATATCCCTCTCCATTCTCCGGGTAAATGATGATAG

SEQ ID NO: 3; PRT; Искусственная последовательность

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLT
 GDTSYNQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYPARSTYVGGDWQFDVWGKG
 TTVTVSS

SEQ ID NO: 4; PRT; Искусственная последовательность

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISC

SEQ ID NO: 5; PRT; Искусственная последовательность

KGSGRTFTSYNMH

SEQ ID NO: 6; PRT; Искусственная последовательность

WVRQMPGKGLEWMG

SEQ ID NO: 7; PRT; Искусственная последовательность

AIYPLTGDTSYNQKSKL

SEQ ID NO: 8; PRT; Искусственная последовательность

QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYP

SEQ ID NO: 9; PRT; Искусственная последовательность

ARSTYVGGDWQFDV

SEQ ID NO: 10; PRT; Искусственная последовательность

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASRVPIHWHYQQKPGQAPRLLIYATSALASGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWLSNPPTFGQGTKLEIKRNDAPAVYLFQPS
 DQLHTGSASVCLLNNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTE
 YLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

SEQ ID NO: 11; ДНК; Искусственная последовательность

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
 CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCCGGAGTGTACCGTACATCCACTGGTACCAGCAGAA
 ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACATCCGCTCTGGCTTCTGGCATCCC
 AGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG

GAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTGGCTGAGTAACCCACCCACTTT
 TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAATGATGCCCAGCCAGCCGTCTATTTG
 TTCCAACCATCTCCAGACCAGTTACACACAGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTTGCTGAA
 TAGCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGTGGATGGTGTTCATCCAAGAC
 ACAGGCATCCAGGAAAGTGTCAACAGAGCAGGACAAGGACAGTACCTACAGCCTCAGCA
 GCACCCTGACGATGTCCAGTACTGAGTACCTAAGTCATGAGTTGTACTCCTGTGAGATC
 ACTCACAAGAGCCTGCCCTCCACCCTCATCAAGAGCTTCCAAAGGAGCGAGTGTGAGA
 GAGTGGAC

SEQ ID NO: 12; PRT; Искусственная последовательность

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASRSPYIHWYQQKPGQAPRLLIYATSALASGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQWLSNPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 13; PRT; Искусственная последовательность

EIVLTQSPGTLSPGERATLSC

SEQ ID NO: 14; PRT; Искусственная последовательность

RASRSPYIH

SEQ ID NO: 15; PRT; Искусственная последовательность

WYQQKPGQAPRLLI

SEQ ID NO: 16; PRT; Искусственная последовательность

YATSALAS

SEQ ID NO: 17; PRT; Искусственная последовательность

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC

SEQ ID NO: 18; PRT; Искусственная последовательность

QWLSNPPT

SEQ ID NO: 19; PRT; Искусственная последовательность

FGQGTKLEIK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с CD20 собаки, содержащее переменную область легкой цепи (LCVR), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 12, и переменную область тяжелой цепи (HCVR), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 3.

2. Антитело, которое специфически связывается с CD20 собаки, содержащее легкую цепь (LC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь (HC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 1.

3. Антитело, которое специфически связывается с CD20 собаки, содержащее две легкие цепи (LC), каждая из которых имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, и две тяжелые цепи (HC), каждая из которых имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

4. Способ лечения лимфомы у пациента-собаки, который включает в себя введение пациенту-собаке со злокачественной лимфомой, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела, содержащего переменную область легкой цепи (LCVR), аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 12, и переменную область тяжелой цепи (HCVR), аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 3, при этом указанное антитело специфически связывается с

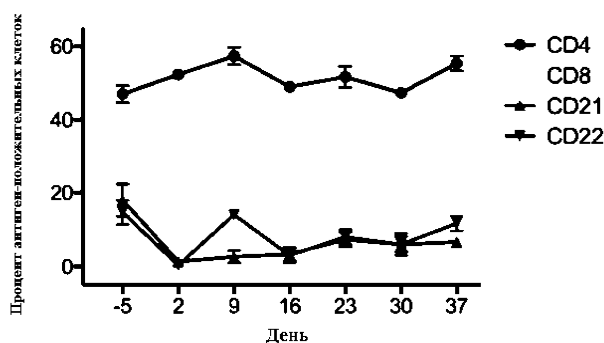
CD20 собаки.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь (LC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь (HC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 1.

6. Набор для лечения лимфомы у пациента-собаки, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую антитело по любому из пп.1-3, с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

7. Применение антитела, содержащего вариабельную область легкой цепи (LCVR), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 12, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 3, при этом указанное антитело специфически связывается с CD20 собаки для лечения лимфомы у пациента-собаки.

8. Применение по п.7, отличающееся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь (LC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь (HC), аминокислотная последовательность которой указана в SEQ ID NO: 1.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2