

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043079

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.25

(21) Номер заявки
202090945

(22) Дата подачи заявки
2018.10.22

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)

(54) АНТИ-MSLN-АНТИТЕЛО И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО

(31) 10-2017-0136565

(32) 2017.10.20

(33) KR

(43) 2020.07.14

(86) PCT/KR2018/012493

(87) WO 2019/078698 2019.04.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН;
МОГАМ ИНСТИТЮТ ФОР
БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (KR)

(72) Изобретатель:
Ким Ки Су, Дзеонг Дзун Хонг, Ким
Донг Сик, Лим Янг Ми, Парк Йонг
Йеа, Лим Хиунг Квон, Вон Дзонг Вха
(KR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KR-A-1020170036503

WO-A1-2017032293

KR-B1-101681795

KR-B1-101554848

ZHANG, Y. F. et al. New High Affinity
Monoclonal Antibodies Recognize Non-Overlapping
Epitopes On Mesothelin For Monitoring And Treating
Mesothelioma. SCIENTIFIC REPORTS. 22 May
2015, vol. 5, no. 09928, pages 1-14. See abstract.

(57) Изобретение относится к анти-MSLN-антителу и фармацевтической композиции для лечения онкологического заболевания, содержащей его. Анти-MSLN-антитело по настоящему изобретению обладает высокой аффинностью и специфичностью к MSLN и, таким образом, может быть эффективно использовано для профилактики или лечения онкологического заболевания.

043079

B1

043079

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к анти-MSLN-антителу и фармацевтической композиции для лечения онкологических заболеваний, содержащей его.

Уровень техники

Среди различных причин смертности часто имеет место смерть в результате онкологических заболеваний, которые составляют вторую по величине долю летальных исходов. В прошлом предпринимались различные попытки лечения онкологических заболеваний. В настоящее время в отношении способов лечения онкологических заболеваний, то они сводятся к введению противоопухолевого средства, лучевой терапии или хирургической операции. Однако такие способы лечения могут быть эффективными на ранних стадиях злокачественного заболевания и имеют низкий терапевтический эффект на терминальных стадиях онкологических заболеваний, когда заболевание распространилось на другие ткани, или когда имеет место его рецидив.

В последнее время в целях поиска лечения онкологических заболеваний без проявления побочных эффектов активно проводились исследования таргетных противоопухолевых агентов с использованием антител. Как правило, герцептин, анти-HER2-антитело, используется для лечения рака молочной железы, и авастин, антитело против сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), используется для лечения колоректального рака. Ключевым фактором при разработке таргетных противоопухолевых агентов с использованием антител является разработка антител против поверхностных мембранных белков, которые сверхэкспрессируются в опухолевых клетках.

Между тем мезотелин (MSLN) представляет собой полипептид-предшественник с молекулярной массой от 69 до 71 кДа и представляет собой гликопротеин, находящийся на поверхности клеток мезотелиального слоя брюшной, плевральной и перикардальной полостей. Однако к настоящему времени функция MSLN четко не выяснена, сообщалось, что избыточная экспрессия MSLN наблюдается при мезотелиоме, раке яичника, раке поджелудочной железы, раке желудка, раке легкого и раке эндометрия, которые представляют собой раковые клетки или опухолевые клетки. Кроме того, результаты исследований показали, что химерные мышиные/человеческие антитела против MSLN ингибируют рост опухолевых клеток в случае, когда опухолевые клетки, в которых сверхэкспрессируется MSLN, подвергаются воздействию таких антител (Hassan R et al., Cancer Immun., 19; 7:20, 2007).

Соответственно, были разработаны мышиные антитела, которые специфически связываются с MSLN. Однако клинические испытания не были успешными за счет отсутствия перекрестной реактивности между гетерологичными индивидуумами. Кроме того, антитела, продуцированные у пациентов, которых подвергли лечению мышиными антителами или химерными антителами, имеют проблемы, связанные с высокой токсичностью или снижением терапевтической эффективности.

Следовательно, существует необходимость в разработке анти-MSLN-антитела, которое может проявлять перекрестную реактивность с человеком, одновременно обладая высокой аффинностью к MSLN.

Техническая проблема

Настоящее изобретение выполнено для решения вышеуказанных проблем предшествующего уровня техники. Целью настоящего изобретения является обеспечение антитела, обладающего высокой аффинностью связывания с мезотелином (MSLN), и фармацевтической композиции, обладающей высокой эффективностью лечения онкологических заболеваний, с использованием его.

Однако проблема, решаемая настоящим изобретением, не ограничивается вышеуказанными проблемами, и другие проблемы, которые не были упомянуты, будут понятны специалистам в данной области техники из следующего описания изобретения.

Решение проблемы

В аспекте настоящего изобретения обеспечивается антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи (VL-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и вариабельную область тяжелой цепи (VH-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 3-5.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается полинуклеотид, который кодирует вариабельную область легкой цепи (VL-область) и вариабельную область тяжелой цепи (VH-область) антитела.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ получения антитела, которое специфически связывается с MSLN, включающий стадию культивирования клетки-хозяина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается фармацевтическая композиция для профилактики или лечения онкологических заболеваний, содержащая антитело или его фрагмент.

Преимущественные эффекты изобретения

За счет высокой аффинности и специфичности к MSLN антитело против MSLN по настоящему изобретению

бретению можно эффективно применять для профилактики или лечения онкологических заболеваний.

Следует понимать, что эффект настоящего изобретения не ограничивается вышеописанными эффектами, и оно включает все эффекты, которые вытекают из конфигурации изобретения, описанного в разделе "Подробное описание" или формуле настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны результаты, полученные в анализе аффинности химерного мышино-го/человеческого IgG1 антитела MI323 к клеткам опухоли поджелудочной железы человека (AsPC1), экспрессирующим MSLN.

На фиг. 2 показаны результаты, полученные в анализе аффинности химерного мышино-го/человеческого IgG1 антитела MI323 к клеткам опухоли поджелудочной железы человека (Capan2), экспрессирующим MSLN.

На фиг. 3 показаны результаты, полученные в анализе аффинности химерного мышино-го/человеческого IgG1 антитела MI323 к мезотелиоме плевры человека (H226), экспрессирующей MSLN.

На фиг. 4 показаны результаты, полученные в анализе аффинности химерного мышино-го/человеческого IgG1 антитела MI323 к клеткам опухоли поджелудочной железы человека (PL45), экспрессирующим MSLN.

На фиг. 5 показаны результаты, полученные в анализе аффинности гуманизированного IgG1 антитела MI323 к клеткам опухоли поджелудочной железы человека (AsPC1), экспрессирующим MSLN.

На фиг. 6 показаны результаты, полученные в анализе аффинности гуманизированного IgG1 антитела MI323 к клеткам опухоли поджелудочной железы человека (Capan2), экспрессирующим MSLN.

На фиг. 7 показаны результаты, полученные в анализе аффинности гуманизированного IgG1 антитела MI323 к мезотелиоме плевры человека (H226), экспрессирующей MSLN.

На фиг. 8 показаны результаты, полученные в анализе аффинности гуманизированного IgG1 антитела MI323 к клеткам опухоли поджелудочной железы человека (PL45), экспрессирующим MSLN.

Подробное описание изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

В аспекте настоящего изобретения обеспечивается антитело, содержащее переменную область легкой цепи (VL-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и переменную область тяжелой цепи (VH-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 3-5.

Переменная область легкой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Переменная область тяжелой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 3-5.

Антитело, содержащее переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, может специфически связываться с мезотелином (MSLN). Здесь MSLN, с которым связывается антитело, может представлять собой MSLN человека. То есть, антитело может специфически связываться с человеческим MSLN или опухолевыми клетками, связанными с ним.

Как здесь используется, термин "MSLN" может относиться к понятию, которое в совокупности относится к самому MSLN и любому его варианту, изолированному и паралогу, которые присутствуют у животного и предпочтительно у человека и обезьяны. Кроме того, как здесь используется, термин "человеческий MSLN" относится к MSLN, происходящему от человека. Как здесь используется, термин "мышинный MSLN" относится к MSLN, происходящему от мыши.

Как здесь используется, термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина (Ig), которая иммунологически реагирует с определенным антигеном, т.е. белковой молекуле, которая функционирует в качестве рецептора, который специфически распознает антиген. Кроме того, антитело может представлять собой полное антитело или фрагмент антитела.

В переменных областях легкой и тяжелой цепи некоторые аминокислоты могут быть замещены, вставлены и/или делецированы при условии, пока сохраняются свойства, соответствующие объекту настоящего изобретения, такие как аффинность и специфичность к MSLN. Например, консервативные аминокислотные замены могут иметь место в переменных областях легкой и/или тяжелой цепи. Консервативная замена означает замену исходной аминокислотной последовательности другим аминокислотным остатком, имеющим сходные с ним свойства.

Например, лизин, аргинин и гистидин имеют сходные свойства в том, что они имеют основную боковую цепь, и аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота имеют сходные свойства в том, что они имеют кислотную боковую цепь. Кроме того, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан имеют сходные свойства в том, что они содержат незаряженную полярную боковую

цепь; аланин, валин, лейцин, треонин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин имеют сходные свойства в том, что они содержат неполярную боковую цепь; и тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин имеют сходные свойства в том, что они содержат ароматическую боковую цепь.

Следовательно, специалистам в данной области техники очевидно, что аминокислотные замены в группе аминокислот, имеющих сходные свойства, как описано выше, не будут вызывать какого-либо существенного изменения свойств. По этой причине антитела, которые претерпели изменения, вызванные консервативной заменой в варибельной области, также включаются в объем настоящего изобретения, если такие антитела сохраняют свойства антитела по настоящему изобретению.

С другой стороны, антитело может специфически связываться с опухолевыми клетками, экспрессирующими MSLN, конкретно с поверхностью опухолевых клеток, посредством специфического связывания с MSLN. Здесь опухолевые клетки, экспрессирующие MSLN, могут включать, не ограничиваясь этим, опухолевые клетки человека.

Варибельные области легкой и тяжелой цепи антитела могут состоять из определяющих комплементарности участков (CDR) и каркасных областей (FR). Как правило, CDR обеспечивают специфичность связывания со специфическими антигенами, и FR функционируют для формирования свернутой структуры антитела, для поддержания связывания CDR или тому подобное.

Антитело может представлять антитело, которое имеет в качестве остова аминокислотную последовательность CDR существующего мышинового анти-MSLN-антитела MI323, и аминокислотную последовательность FR и константной области (Fc) человеческого антитела, сходного с MI323, в котором некоторые аминокислотные остатки частей CDR и FR находятся в форме, будучи замещенными, так что эти остатки могут специфически связываться с человеческими.

Антитело может содержать CDR1 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR3 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR1 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-14; CDR2 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-17; и CDR3 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном варианте осуществления антитело может содержать CDR1 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR3 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR1 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CDR2 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и CDR3 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Антитело может содержать CDR1 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR3 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR1 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и CDR3 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Антитело может содержать CDR1 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR3 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR1 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR2 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и CDR3 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Следовательно, антитело может представлять гуманизованное антитело, которое специфически связывается с MSLN человека. Как здесь используется, термин "гуманизованное антитело" относится к химерному антителу, которое содержит минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина антитела, отличного от человеческого, такого как мышинное антитело, и может означать такое антитело, в котором все части, за исключением последовательности, соответствующей гиперварибельной области, замещены их человеческими аналогами.

Кроме того, термин "гиперварибельная область (HVR)" относится к области варибельного домена, которая проявляет гиперварибельность или образует структурно определенную петлю в последовательности антитела. Среди определений, идентифицирующих ее, определение определяющего комплементарности участка (CDR) согласно системе Kabat чаще всего используется для классификации областей на основе варибельности последовательности.

Также можно использовать фрагмент антитела при условии, что фрагмент антитела сохраняет функцию антитела. Антитело или фрагмент антитела могут включать, не ограничиваясь этим, одноцепочечные антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd, scFv, доменные антитела, мини-тела, scAb, IgD антитела, IgE антитела, IgM антитела, IgG1 антитела, IgG2 антитела, IgG3 антитела, IgG4 антитела, производные константных областей антител, искусственные антитела на основе

белковых каркасов и тому подобное, которые сохраняют функцию связывания с MSLN.

Антитело также можно использовать в форме конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), полученного посредством связывания антитела с противоопухолевым лекарственным средством, обладающим эффективностью ингибирования пролиферации опухолевых клеток. Как здесь используется, термин "противоопухолевое" включает "профилактическое" и "лечебное" воздействие на злокачественную опухоль, и "профилактика" означает любое действие, направленное на ингибирование или задержку развития онкологических заболеваний. Кроме того, "лечение" означает любое действие, направленное на ослабление или целебное изменение симптомов онкологических заболеваний.

Лекарственное средство, которое можно использовать в конъюгате антитело-лекарственное средство, включает любое соединение, обладающее цитотоксическим или цитостатическим действием, и часть или функциональную группу соединения. Примеры лекарственного средства включают ингибиторы полимеризации микротубулина, ингибиторы мейоза, ингибиторы РНК-полимеразы, ингибиторы топоизомеразы, интеркаляторы ДНК, алкиляторы ДНК, ингибиторы рибосомы, миРНК, shРНК, siРНК, радиоизотопы и токсины, среди которых можно использовать по меньшей мере одно соединение.

Лекарственное средство может включать, не ограничиваясь этим, майтанзиноид, ауристин, доластин, трихотецен, CC1065 (NSC 298223), калихеамицин, таксан, антрациклин, метотрексат, адриамицин, виндезин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин, дауномицин, этопозид, тенипозид, карминомицин, аминоптерин, дактиномицин, митомицины, блеомицины, эсперамицины, другие энединовые антибиотики, 5-фторурацил, другие азотистые иприты и их стереоизомеры, изостеры, гомологи или производные, цисплатин и гомологи цисплатина, другие интеркаляторные ферменты и их фрагменты, например нуклеазы, антибиотики, токсины (ферментативно активные токсины или низкомолекулярные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения) и различные противоопухолевые или противораковые агенты, такие как цисплатин, СРТ-11, паклитаксел и доцетаксел.

Кроме того, радиоизотоп (радионуклид) включает ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re и тому подобное. Также можно использовать микроРНК (миРНК), siРНК, shРНК и тому подобное, которые могут ингибировать экспрессию некоторых онкогенов.

Связывание анти-MSLN-антитела с лекарственным средством предпочтительно достигается конъюгацией с использованием функциональной группы, такой как тиоловая группа аминокислотного остатка, такого как лизин или цистеин, в антителе. При необходимости также можно провести конъюгацию в линкер-опосредованной форме, которая обычно используется. Также можно использовать линкер на основе малеимида или иодацетамида.

Когда лекарственное средство конъюгировано с антителом или его фрагментом, то лекарственное средство может быть конъюгировано с С-концевым сайтом, противоположным антигенсвязывающему сайту, для снижения влияния на способность или специфичность связывания антитела или фрагмента с MSLN и тому подобное. Когда используется полное антитело, а не его фрагмент, то лекарственное средство может быть конъюгировано с Fc-областью.

Кроме того, антитело также можно использовать в качестве терапевтического агента на основе химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего его. Примеры такого терапевтического средства предпочтительно включают, не ограничиваясь этим, терапевтические средства на основе Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетка) или природной клетки-киллера с химерным антигенным рецептором (CAR-NK-клетка).

Антитело также можно использовать в форме биспецифического антитела, включающего антитело против MSLN. Биспецифическое антитело представляет антитело, которое обладает способностью связываться с двумя антигенами одновременно и, как правило, может находиться в форме, в которой пары тяжелых и легких цепей, которые связываются с различными антигенами, соединены друг с другом.

Кроме того, биспецифическое антитело доступно в форме, такой как биспецифическое одноцепочечное антитело, где фрагменты одноцепочечного антитела (scFv), в которых VL и VH связаны друг с другом посредством короткого линкерного пептида, связаны в форме scFv1-scFv2(-Fc), двойного антитела на основе однодоменного антитела (sdAb), с использованием VH, и биспецифического антитела, полученного с использованием технологии BiTE (см. <http://www.micromet.de>) от Micromet, Германия.

Биспецифическое антитело может находиться в форме, в которой анти-MSLN-антитело связано с антителом или его фрагментом, обладающим способностью связываться с молекулой-мишенью, специфичной для иммуноэффективной клетки. Молекула-мишень, специфичная для иммуноэффективной клетки, предпочтительно может быть выбрана, не ограничиваясь этим, из TCR/CD3, CD16 (FcγRIIIa), CD44, CD56, CD69, CD64 (FcγRI), CD89 и CD11b/CD18 (CR3).

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается полинуклеотид, кодирующий вариативную область легкой цепи (VL-область) и вариативную область тяжелой цепи (VH-область) антитела в соответствии с настоящим изобретением, и вектор экспрессии, содержащий его.

Полинуклеотид, который кодирует вариативную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела, т.е. ген, может быть легко получен специалистами в данной области из аминокислотной после-

довательности анти-MSLN-антитела.

Как здесь используется, термин "вектор экспрессии" относится к рекомбинантному вектору, способному экспрессировать целевой белок в клетке-хозяине, и означает генную конструкцию, которая содержит важные регуляторные элементы, операбельно связанные с ней, для экспрессии вставленного гена. Ген, кодирующий анти-MSLN-антитело, может быть вставлен в отдельный вектор или может быть использован в форме вставки в один и тот же вектор.

В частности, полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность анти-MSLN-антитела, можно использовать в форме вставки в отдельный или один и тот же вектор, и полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь или ее вариабельную область, можно использовать в форме вставки в отдельный или один и тот же вектор.

Как здесь используется, термин "операбельно связанный" означает, что регуляторная последовательность экспрессии нуклеиновой кислоты и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая желаемый белок, операбельно связаны для выполнения желаемой функции. Операбельная связь с рекомбинантным вектором может быть достигнута с использованием методов генетической рекомбинации, хорошо известных в данной области, и сайт-специфическое расщепление и лигирование ДНК может быть легко достигнуто с использованием ферментов и тому подобное, хорошо известных в данной области.

Векторы экспрессии, подходящие для продуцирования анти-MSLN-антитела, могут содержать сигнальные последовательности для нацеливания на мембраны или секретины в дополнение к регуляторным элементам экспрессии, таким как промоторы, кодоны инициации, кодоны терминации, сигналы полиадезинирования и энхансеры. Кодоны инициации и кодоны терминации обычно считаются частью нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуногенный целевой белок. Такие кодоны должны быть функциональными у индивидуума при введении генной конструкции и должны находиться в рамке считывания с кодирующей последовательностью. В общем, промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными. Промотор может включать, не ограничиваясь этим, прокариотические промоторы, такие как *lac*, *tac*, T3 и T7, промоторы обезьяньего вируса 40 (SV40), промоторы вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), например, промотор длинного концевой повтора (LTR) ВИЧ, промоторы вируса лейкоза мышей Молони, промоторы цитомегаловируса (CMV), промоторы вируса Эпштейна-Бара (EBV), промоторы вируса саркомы Рауса (RSV), а также промоторы Р-актина, эукариотические промоторы человеческого гемоглобина, человеческого креатина мышечной ткани, человеческого металлотионеина и тому подобное.

Вектор экспрессии может дополнительно содержать селективируемый маркер, который позволяет отбирать клетки-хозяева, содержащие его. Селективируемый маркер используется для отбора клеток, трансформированных вектором. В качестве селективируемого маркера можно использовать маркеры, которые придают селективируемый фенотип, такой как лекарственная устойчивость, ауксотрофия, устойчивость к цитотоксическим агентам или экспрессия поверхностных белков. В среде, обработанной селективным агентом, выживают только клетки, экспрессирующие селективируемый маркер, что позволяет отобрать трансформированные клетки. Кроме того, когда вектор является реплицируемым вектором экспрессии, то такой вектор может содержать ориджин репликации, представляющий собой специфическую нуклеиновокислотную последовательность, из которой иницируется репликация.

В качестве рекомбинантного вектора экспрессии для вставки чужеродного гена можно использовать различные формы векторов, такие как плазмиды, вирусы и космиды. Тип рекомбинантного вектора конкретным образом не ограничивается при условии, что вектор функционирует для экспрессии желаемого гена и продуцирования желаемого белка в различных клетках-хозяевах, включая прокариотические и/или эукариотические клетки. Вектор может предпочтительно представлять вектор, способный продуцировать большое количество чужеродного белка, который находится в форме, сходной с его природным состоянием, при этом имея промотор с высокой активностью и высокой способностью экспрессии.

Для экспрессии анти-MSLN-антитела можно использовать различные комбинации хозяин/вектор экспрессии. Вектор экспрессии, подходящий для эукариотических хозяев, включает, не ограничиваясь этим, регуляторные последовательности экспрессии, полученные из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса, аденоассоциированного вируса, цитомегаловируса и ретровируса. Вектор экспрессии, который можно использовать в бактериальных хозяевах, включает бактериальные плазмиды, полученные из *Escherichia coli*, такие как pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, вектор pUC, colE1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные; плазмиды, имеющие широкий ряд хозяев, такие как RP4; ДНК-фаги, примером которых может служить широкий ряд производных лямбда фагов, таких как λ gt10, λ gt11 и NM989; и другие ДНК-фаги, такие как M13 и нитчатые одноцепочечные ДНК-фаги. Вектор экспрессии, пригодный для дрожжевых клеток, может включать 2-микронные плазмиды и их производные. Вектор, пригодный для клеток насекомых, может представлять собой pVL941.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии в соответствии с настоящим изобретением. Вектор экспрессии может быть вставлен в клетку-хозяин с образованием трансформанта. Подходящая клетка-хозяин для вектора может включать прокариотические клетки, такие как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Pseudo-*

monas sp., *Proteus mirabilis* или *Staphylococcus* sp. Кроме того, клетка-хозяин может включать эукариотические клетки, включая клетки низших эукариот из грибов, таких как *Aspergillus* sp., дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp. и *Neurospora crassa*, и другие низшие эукариоты, а также высшие эукариотические клетки, такие как клетки насекомых. Кроме того, клетка-хозяин также может быть получена из растений или млекопитающих. Предпочтительно клетка-хозяин, которую можно использовать, включает, не ограничиваясь этим, клетки почки зеленой мартышки (клетки COS7), клетки NSO (клетки мышинной миеломы), клетки SP2/0 (клетки мышинной миеломы), другие клетки миеломной линии, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки W138 (культура диплоидных клеток человека), клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки MDCK, HuT 78, клетки HEK293 и тому подобное, где предпочтительными являются клетки CHO.

Как здесь используется, термин "трансформация в клетки-хозяева" предназначен для включения любого метода введения нуклеиновой кислоты в организм, клетку, ткань или орган, и такую трансформацию можно выполнить с использованием стандартной методики, известной в данной области техники, выбранной в зависимости от типа клетки-хозяина. В частности, можно использовать электропорацию, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция (CaPO_4) осаждение хлоридом кальция (CaCl_2), перемешивание с использованием волокна карбида кремния, трансформацию, опосредованную *Agrobacterium*, трансформацию, опосредованную ПЭГом, декстраном сульфатом, липофектамином или высушиванием/ингибированием или тому подобное. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими методами.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ получения антитела, которое специфически связывается с MSLN, включающий культивирование клетки-хозяина. В частности, способ получения антитела может включать стадии: вставку в вектор нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-MSLN-антитело, для конструирования рекомбинантного вектора; трансформацию клетки-хозяина рекомбинантным вектором и проведение культивирования; и отделение и очистку гуманизированного антитела от культивированного трансформанта.

Гуманизированные антитела можно получить в большом количестве культивированием трансформанта, в котором экспрессируется рекомбинантный вектор, в питательной среде, и среду и условия культивирования можно соответствующим образом выбрать из тех, которые известны в данной области, в зависимости от типа клетки-хозяина. Во время культивирования такие условия, как температура, pH среды и время культивирования могут быть соответствующим образом скорректированы, чтобы они подходили для роста клеток и массовой продукции белка.

Полученные рекомбинантным способом анти-MSLN-антитела, как описано выше, можно выделить из среды или клеточного лизата. Когда антитело находится в мембраносвязанной форме, то такое антитело можно выделить из мембраны с использованием подходящего раствора поверхностно-активного вещества (например, Triton-X 100) или ферментативным расщеплением. Клетки, используемые для экспрессии гуманизированных антител, можно подвергнуть разрушению с использованием различных физических и химических способов, таких как циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком, механическое разрушение или применение агентов, лизирующих клетки, и разделение и очистку можно выполнить с использованием обычных методов биохимического разделения. Метод биохимического разделения, который можно использовать, включает, не ограничиваясь этим, электрофорез, центрифугирование, гель-фильтрацию, осаждение, диализ, хроматографию (ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, иммуноабсорбционную хроматографию, эксклюзионную хроматографию или тому подобное), изоэлектрическое фокусирование и тому подобное.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается фармацевтическая композиция для профилактики или лечения онкологических заболеваний, содержащая антитело по настоящему изобретению или его фрагмент.

Тип онкологических заболеваний, который можно лечить с помощью фармацевтической композиции, может включать как солидный рак, так и рак крови и предпочтительно может включать, не ограничиваясь этим, любые типы опухолей, которые экспрессируют MSLN, такие как мезотелиома, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желудка, рак легкого или рак эндометрия.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. В качестве фармацевтически приемлемого носителя для перорального введения можно использовать связующее вещество, скользящее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизатор, диспергатор, стабилизатор, суспендирующий агент, пигмент, ароматизатор и тому подобное; буфер, консервант, обезболивающее средство, солюбилизатор, изотонический агент, стабилизатор и тому подобное можно использовать в смеси для инъекций; и основу, эксципиент, скользящее вещество, консервант и тому подобное можно использовать для местного применения.

Состав фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть приготовлен различными способами посредством смешивания с фармацевтически приемлемым носителем, как описано выше. Например, для перорального введения фармацевтическая композиция может быть составлена в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток или тому подобное. Для инъекций фармацевтическая композиция может быть сформулирована в виде ампул с разовыми дозами или

форм с множеством доз.

Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать поверхностно-активное вещество, которое может повышать проницаемость мембраны. Такие поверхностно-активные вещества могут быть получены из стероидов или могут включать катионные липиды, такие как хлорид N-[1-(2,3-диолеил)пропил-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), или различные соединения, такие как холестерина гемисукцинат и фосфатидилглицерин. Однако поверхностно-активное вещество этим не ограничивается.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ лечения онкологического заболевания или ингибирования роста злокачественной опухоли, включающий введение фармацевтической композиции индивидууму. Фармацевтическую композицию, содержащую анти-MSLN-антитело, можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для воздействия на опухолевые клетки или их метастазы или для ингибирования роста злокачественной опухоли. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как тип онкологического заболевания, возраст пациента, масса тела, характер и тяжесть симптомов, тип текущей терапии, количество видов лечения, лекарственная форма и способ введения, и может быть легко определено специалистами в соответствующей области.

Фармацевтическую композицию можно вводить вместе или последовательно с вышеуказанными фармакологическими или физиологическими компонентами и также можно вводить в комбинации с дополнительными обычными терапевтическими агентами, и в этом случае фармацевтическую композицию можно вводить последовательно или одновременно с обычными терапевтическими агентами. Такое введение может быть однократным или многократным. Принимая во внимание все вышеуказанные факторы, важно вводить количество, которое является минимальным количеством и позволяет обеспечить максимальный эффект без проявления побочных эффектов, и такое количество может легко определить специалист в данной области техники.

Как здесь используется, термин "индивидуум" относится к млекопитающему, предпочтительно человеку, страдающему или имеющему риск развития патологического состояния или заболевания, которое можно облегчить, подавить или лечить введением фармацевтической композиции.

Как здесь используется, термин "введение" означает введение заранее определенного вещества индивидууму любым подходящим способом, и фармацевтическую композицию можно вводить любым путем, при условии, что путь позволяет фармацевтической композиции достичь ткани-мишени. Такой способ введения может включать, без ограничения, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, пульмонарное введение или ректальное введение. Здесь, в случае перорального введения, с точки зрения того, что белки подвергаются перевариванию, может быть желательным формулировать композицию для перорального применения таким образом, чтобы активный агент был покрыт оболочкой или композиция была защищена от переваривания в желудке. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить с использованием любого устройства, так чтобы активный ингредиент мог мигрировать в его клетку-мишень.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается применение антитела по настоящему изобретению для профилактики или лечения онкологического заболевания.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается применение антитела по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для профилактики или лечения онкологического заболевания.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ профилактики или лечения онкологического заболевания, включающий введение антитела по настоящему изобретению индивидууму.

Наилучший способ осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью примеров. Следующие примеры описаны с целью иллюстрации настоящего изобретения, и объем настоящего изобретения этим не ограничивается.

Пример 1. Получение гуманизированных анти-MSLN-антител

Пример 1.1. Селекция антител-кандидатов для гуманизации.

Аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи (VL-область) и вариабельной области тяжелой цепи (VH-область) мышинового антитела MI323, известного как анти-MSLN-антитело, вводили в базу данных web (IgBLAST) и затем проводили поиск наиболее сходных последовательностей эмбриональных антител человека. В результате наибольшее сходство аминокислотной последовательности было показано между вариабельной областью легкой цепи мышинового антитела MI323 и *Homo sapiens* IGKV7-39*01 (название гена в базе данных IMGT) и между вариабельной областью тяжелой цепи мышинового антитела MI323 и *Homo sapiens* IGHV1-3*01 (название гена в базе данных IMGT).

Пример 1.2. Гуманизация вариабельной области легкой цепи

Аминокислотную последовательность CDR *Homo sapiens* IGKV7-39*01 (название гена в базе данных IMGT), человеческого эмбрионального антитела, имеющего последовательность, наиболее сходную с вариабельной областью легкой цепи MI323, заменяли последовательностью CDR мышинового антитела

MI323, с получением частично гуманизированной вариабельной области легкой цепи MI323.

Для усиления антигенсвязывающих свойств частично гуманизированной вариабельной области легкой цепи MI323 аминокислотные остатки в последовательностях CDR, которые, как полагают, играют важную функцию в обеспечении антигенсвязывающих свойств, заменяли такими же аминокислотными остатками, что и в Homo sapiens IGKV7-39*01 (название гена в базе данных IMGT). Полученная таким образом аминокислотная последовательность гуманизированной вариабельной области легкой цепи MI323 показана в табл. 1 ниже.

Как показано в табл. 1, гуманизированную вариабельную область легкой цепи MI323 получали заменой 24-го аминокислотного остатка в вариабельной области легкой цепи мышинового антитела MI323, лизина (K) на аргинин (R). Здесь вариабельную область легкой цепи мышинового антитела MI323 использовали в качестве контроля для сравнения аффинности к антигену MSLN.

Таблица 1

Клон	Вариабельная область	Аминокислотная последовательность (участки, выделенные жирным шрифтом, указывают CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи по порядку)	SEQ ID NO
VL-1	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYS ASYRYP GVPSRFGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYC QQHYSTPWT FGGGTKLEIKR	1
MI 323	Легкая цепь	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCK ASQDVSTAVAWY QKPGQSPKLLIYS ASYRYP GVDPDRFTGSGSGTDFTFT ISSVQAEDLALYYC QQHYSTPWT FGGGTKLEIKR	2

Пример 1.3. Гуманизация вариабельной области тяжелой цепи

Аминокислотную последовательность CDR Homo sapiens IGHV1-3*01 (название гена в базе данных IMGT), человеческого эмбрионального антитела, имеющего последовательность, наиболее сходную с вариабельной областью тяжелой цепи MI323, заменяли последовательностью CDR мышинового антитела MI323, с получением частично гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи MI323.

Для усиления антигенсвязывающих свойств частично гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи MI323, аминокислотные остатки в последовательностях CDR и каркасной области (FR), которые, как полагают, играют важную функцию в обеспечении антигенсвязывающих свойств, заменяли такими же аминокислотными остатками, что и в мышинном антителе MI323. Полученная таким образом аминокислотная последовательность гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи MI323 показана в табл. 2 ниже.

Как показано в табл. 2, были сделаны случайные модификации аминокислотных остатков в CDR и FR вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела MI323, с получением в общей сложности 3 гуманизированных вариабельных областей тяжелой цепи MI323. Здесь вариабельную область тяжелой цепи мышинового антитела MI323 использовали в качестве контроля для сравнения аффинности к антигену MSLN.

Таблица 2

Клон	Вариабельная область	Аминокислотная последовательность (участки, выделенные жирным шрифтом, указывают CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи по порядку)	SEQ ID NO
VH-1	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYFMH WVRQAPGQRLEWMGW IFPGNGNTKYSQKFQ GRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGGYQYYF DYWGQ GLTVTVSS	3
VH-2	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTSYFISW VRQAPGGGLEWMGG IFPGSGNANYAQKFQ GRVTIT ADESTSTAYMEISSLRSEDTAVYYCARSGGYQYYFD YWGQ GLTVTVSS	4
VH-3	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYSFTSYFIQW VRQAPGGGLEWIG WIFPGSGNTKYSQKFQ GRVTITR DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGGYQYYFDY WGQ GLTVTVSS	5
MI 323	Тяжелая цепь	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYSFTSYFIQWV KQRPQGGLWIG WIFPGSGNTKYNEMFKG KATLAA DTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGYQYYFDY WGQ GLTSVTVSS	6

Пример 1.4. Клонирование гуманизированных анти-MSLN-антител

Каждый ген одной вариабельной области легкой цепи (VL-1), как получено выше, и ген вариабельной области легкой цепи MI323 вставляли в вектор экспрессии pcDNA3.4 для клеток животных, содержащий константную область легкой цепи каппа (κ-CL). Кроме того, каждый из генов 3 вариабельных

областей тяжелой цепи (VH-1, VH-2, VH-3) и ген варибельной области тяжелой цепи MI323 были встроены в вектор экспрессии pcDNA3.4 для клеток животных, содержащий константные области IgG1 (CH1, шарнирная область, CH2, CH3).

Соответствующие специфические аминокислотные последовательности для константной области легкой цепи каппа и константной области тяжелой цепи IgG1 показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Клон	Константная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
к	Легкая цепь	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	7
IgG1	Тяжелая цепь	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	8

Пример 1.5. Трансфекция гуманизированных анти-MSLN-антител

За 24 ч до трансфекции клетки Expi293F с плотностью $2,0 \times 10^6$ клеток/мл пассировали в среде Expi293 в термостате со встряхиванием со скоростью 125 ± 10 об/мин в условиях 37°C и 8% CO_2 . Когда выполняли трансфекцию, то измеряли количество клеток и оценивали жизнеспособность клеток, для определения наличия жизнеспособности клеток на уровне 95% или выше.

Клетки помещали с титром $7,5 \times 10^7$ клеток в культуральную колбу емкостью 125 мл и затем добавляли среду Expi293 для доведения конечного объема до 25 мл (из расчета на 30 мл). Используя среду Opti-MEM I, 30 мкг экспрессирующего антитело вектора смешивали с общим объемом 1,5 мл и проводили инкубацию в течение 5 мин при комнатной температуре. Для векторов антител в целом использовали 3 гуманизированных IgG1 антитела MI323, полученных комбинированием вектора экспрессии для одной варибельной области легкой цепи и векторов экспрессии для 3 варибельных областей тяжелой цепи. В качестве вектора контрольного антитела использовали химерное мышиное/человеческое IgG1 антитело MI323.

Используя среду Opti-MEM I, 80 мкл реагента для трансфекции смешивали с общим объемом 1,5 мл и проводили инкубацию в течение 5 мин при комнатной температуре. Среду Opti-MEM I, соответственно содержащую вектор и реагент для трансфекции, осторожно перемешивали и оставляли взаимодействовать при комнатной температуре на 20 мин. Затем полученную смесь помещали в колбу, содержащую клетки Expi293F. Инкубацию проводили в термостате со встряхиванием со скоростью 125 ± 10 об/мин в течение 16-20 ч при 37°C и 8% CO_2 . Затем добавляли 1,5 мл усилителя трансфекции I и 150 мкл усилителя трансфекции II и проводили инкубацию в течение 6 суток для получения антител.

Пример 1.6. Очистка антител

Инкубационную смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и затем удаляли клеточный дебрис с получением супернатанта. 0,2 мл смолы Mabselect Xtra добавляли на колонку и уравнивание проводили с использованием буфера, связывающегося с белком А, в объеме, соответствующем 10-кратному объему смолы.

Затем супернатант загружали на колонку под действием силы тяжести. После завершения загрузки колонку промывали буфером, связывающимся с белком А, в объеме, соответствующем 10-кратному объему смолы.

Затем на колонку добавляли элюирующий IgG буфер и проводили элюирование. Элюат нейтрализовали добавлением 25 мкл 1,5 М Трис-Cl на 1 мл элюата. Затем концентрацию элюата измеряли при OD 280 нм. Элюент, для которого была измерена концентрация, подвергали диализу с буферным обменом с PBS.

Пример 2. Измерение аффинности гуманизированных анти-MSLN-антител к рекомбинантному MSLN

Систему Octet использовали для измерения аффинности к рекомбинантному MSLN гуманизированных анти-MSLN-антител (HMI323), полученных как описано в примере 1. "HMI323" относится к "гуманизированному MI323".

В частности, раствор рекомбинантного человеческого MSLN готовили в концентрации 5 мкг/мл в $1 \times$ кинетическом буфере и использовали для обработки 96-луночного планшета из расчета 200 мкл/луноку. MSLN после обработки фиксировали на биосенсоре анти-Penta His (HISIK, Cat # 18-5121, Fortebio).

Затем 3 гуманизированных анти-MSLN-антитела, полученных как описано в примере 1, и химерные мышиные/человеческие клоны IgG1 MI323 разводили до концентрации 50, 25, 12,5, 6,25 или 3,125 нМ в 1 × кинетическом буфере и обрабатывали из расчета 200 мкл/лунку. Для приготовления 1 × кинетического буфера использовали буфер, полученный 10-кратным разведением 10 × кратного кинетического буфера (ForteBio, Cat # 18-1092) с PBS.

Взаимодействие между MSLN, фиксированным на биосенсоре, и антителом в нескольких концентрациях анализировали для расчета аффинности антиген-антитело, и результаты приведены в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Клон	ka (1/М·с)	kd (1/с)	KD (нМ)
MI323	4,54×10 ⁵	1,30×10 ⁻⁵	0,0286
HMI323VL-1/HMI323VH-1	6,65×10 ⁵	9,25×10 ⁻⁵	0,139
HMI323VL-1/HMI323VH-2	1,86×10 ⁶	5,09×10 ⁻⁴	0,273
HMI323VL-1/HMI323VH-3	8,42×10 ⁵	2,75×10 ⁻⁵	0,0327

Как видно из результатов, представленных в табл. 4, было установлено, что комбинация HMI323VL-1/HMI323VH-3 сохраняет наиболее близкую аффинность к MI323, и было установлено, что два других клон демонстрируют несколько более низкую аффинность по сравнению с антителом MI323, но в целом сохраняют высокую аффинность к MSLN.

Пример 3. Измерение аффинности гуманизированных анти-MSLN-антител к MSLN, экспрессированному на поверхности опухолевых клеток

Проточную цитометрию использовали для идентификации того, насколько гуманизированные анти-MSLN-антитела (HMI323), полученные как описано в примере 1, также проявляют аффинность к MSLN, экспрессированному на поверхности опухолевых клеток.

В частности, клетки каждой из линий H226 (мезотелиома), AsPC-1 (рак поджелудочной железы), Саран-2 (рак поджелудочной железы) и PL45 (рак поджелудочной железы) центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин и затем три раза промывали буфером FACS (PBS, содержащим 3% FBS). Затем соответствующие опухолевые клетки в концентрации 3×10⁶ клеток/мл разбавляли буфером FACS и использовали при 100 мкл для обработки каждой лунки 96-луночного планшета.

Затем каждое химерное мышиное/человеческое IgG1 антитело MI323 и IgG1 антитело HMI323VL-1/HMI323VH-3 добавляли в каждую лунку в концентрации 5 мкг/мл, смешивали с клетками и затем инкубировали при 4°C в течение 1 ч. Затем проводили центрифугирование при 1500 об/мин в течение 5 мин и затем супернатант отбрасывали. Процедуру, в которой 200 мкл буфера FACS добавляли к этой смеси для ресуспендирования и отмывки клеток, повторяли три раза.

Затем процедуру, в которой конъюгированное с фикоэритрином (PE) человеческое IgG антитело разводили в 500 раз буфером FACS и использовали для промывания клеток, повторяли три раза. Отмытые клетки фиксировали с использованием 100 мкл BD Cytofix™, и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) каждого образца с помощью прибора LSRFortessa™ (проточный цитометр). Результаты анализа представлены на фиг. 1-8.

Как показано на фиг. 1-8, было установлено, что все антитела, которые связывались с рекомбинантным MSLN человека, также специфически связывались с опухолевыми клетками, экспрессирующими человеческий MSLN.

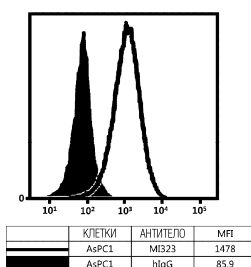
Несмотря на то, что варианты осуществления были описаны с помощью ограниченного числа примеров и фигур, приведенных выше, специалистам в данной области техники будет очевидно, что можно сделать различные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема изобретения. Например, желаемых результатов можно достичь даже в случае, когда описанные методики выполняются в другом порядке, чем описанный способ, и/или описанные компоненты составлены или объединены в форме, отличной от описанного способа, или заменены или замещены другими компонентами или эквивалентами.

Следовательно, другие выполнения, другие варианты осуществления и эквиваленты прилагаемой формулы изобретения попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

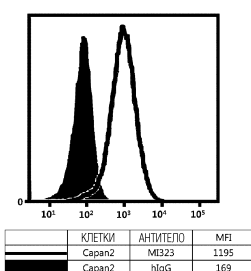
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с мезотелином (MSLN), содержащее
 вариабельную область легкой цепи (VL-область), состоящую из последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; и
 вариабельную область тяжелой цепи (VH-область), состоящую из последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 3-5.
2. Антитело по п.1, где MSLN представляет MSLN человека.
3. Антитело по п.1, где антитело специфически связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими MSLN.

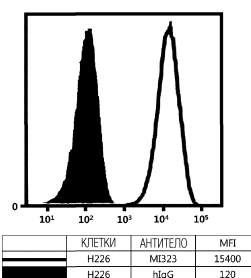
4. Антитело по п.3, где опухолевая клетка, экспрессирующая MSLN, является опухолевой клеткой человека.
5. Антитело по п.1, где антитело представляет гуманизированное антитело.
6. Полинуклеотид, который кодирует переменную область легкой цепи (VL-область) и переменную область тяжелой цепи (VH-область) антитела по п.1.
7. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.6.
8. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.7.
9. Способ получения антитела, которое специфически связывается с MSLN, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8.
10. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения онкологического заболевания, содержащая антитело по п.1 или его фрагмент.
11. Фармацевтическая композиция по п.10, где рак представляет мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желудка, рак легкого или рак эндометрия.
12. Применение антитела по п.1 для профилактики или лечения онкологического заболевания.
13. Применение антитела по п.1 для производства лекарственного средства для профилактики или лечения онкологического заболевания.
14. Способ профилактики или лечения онкологического заболевания, включающий введение антитела по п.1 индивидууму.



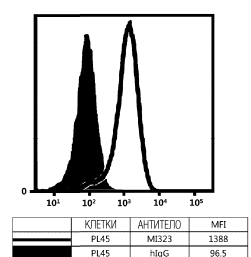
Фиг. 1



Фиг. 2

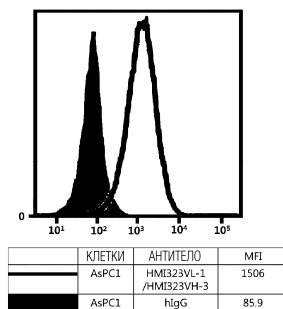


Фиг. 3

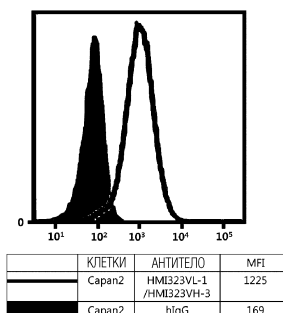


Фиг. 4

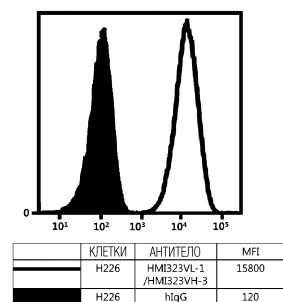
043079



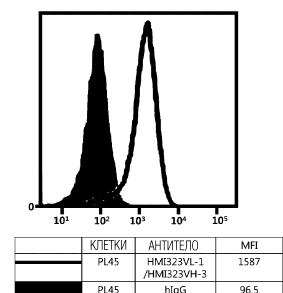
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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