



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 177 805** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 39/395, C 07 K 16/46**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 99119493/14, 12.02.1998

(24) Дата начала действия патента: 12.02.1998

(30) Приоритет: 12.02.1997 JP 9/41410

(46) Дата публикации: 10.01.2002

(56) Ссылки: WO 87/00054 A, 15.01.87. WO 90/05537 A, 31.05.90.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 13.09.1999

(86) Заявка РСТ:  
JP 98/00568 (12.02.1998)

(87) Публикация РСТ:  
WO 98/35698 (20.08.1998)

(71) Заявитель:  
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

(72) Изобретатель: КОИСИХАРА Ясуо (JP),  
ЕСИМУРА Ясуси (JP)

(73) Патентообладатель:  
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

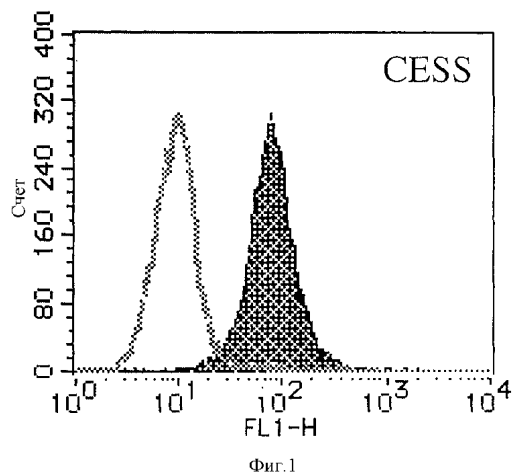
(74) Патентный поверенный:  
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **СРЕДСТВО, ПРИМЕНЯЕМОЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ ТКАНИ**

(57)

Изобретение относится к медицине. Сущность его составляет лекарственное средство, применяемое при лечении опухолей лимфатической ткани (за исключением миеломы), включающее в качестве активного ингредиента антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, в описании, и которое обладает цитотоксической активностью. Указанное антитело содержит константную область C<sub>γ</sub> или представляет собой химерное антитело против HM1. Технический результат - расширение арсенала средств против опухолей лимфатической ткани. 2 с. и 17 з. п. ф-лы, 27 ил., 1 табл.

**B-1**



RU 2 177 805 C2

RU 2 177 805 C2



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 177 805** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 39/395, C 07 K 16/46**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

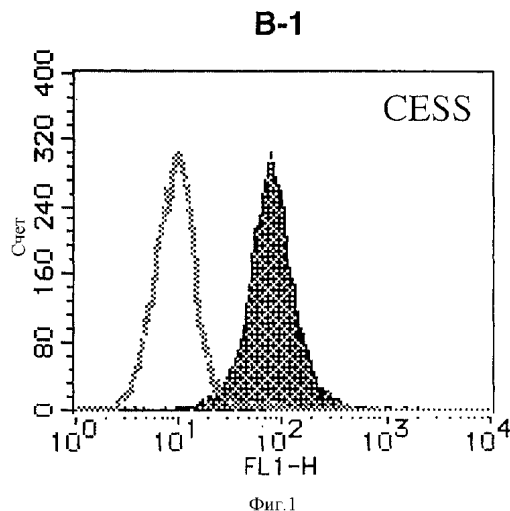
(21), (22) Application: 99119493/14, 12.02.1998  
(24) Effective date for property rights: 12.02.1998  
(30) Priority: 12.02.1997 JP 9/41410  
(46) Date of publication: 10.01.2002  
(85) Commencement of national phase: 13.09.1999  
(86) PCT application:  
JP 98/00568 (12.02.1998)  
(87) PCT publication:  
WO 98/35698 (20.08.1998)

(71) Applicant:  
ChUGAI SEJJaKU KABUSIKI KAJSJa (JP)  
(72) Inventor: KOISIKhARA Jasuo (JP),  
ESIMURA Jasusi (JP)  
(73) Proprietor:  
ChUGAI SEJJaKU KABUSIKI KAJSJa (JP)  
(74) Representative:  
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) AGENT USED IN TREATMENT OF LYMPHATIC TISSUE TUMORS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology, pharmacy.  
SUBSTANCE: invention relates to medicinal agent used in treatment of patients with tumors of lymphatic tissue (with exception of myeloma) including antibody as an active component that binds with protein specifically. This protein has amino acid sequence indicated in SEQ ID NO : 1 in description that shows cytotoxic activity. Indicated antibody has constant region C $\gamma$  or it is a chimeric antibody against H 1. EFFECT: broadened arsenal of agents against tumors of lymphatic tissue. 19 cl, 27 dwg, 3 ex



RU 2 177 805 C2

RU 2 177 805 C2

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Изобретение относится к средствам, применяемым при лечении опухолей лимфатических тканей (за исключением миеломы), включающим в качестве активного ингредиента антитела, которые специфически связываются с белками, экспрессируемыми в указанных опухолях лимфатической ткани. Настоящее изобретение относится также к средствам, применяемым при лечении опухолей Т-клеток или опухолей В-клеток (за исключением миеломы). Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белками, экспрессируемыми в опухолях лимфатических тканей, и которые обладают цитотоксической активностью.

Предпосылки создания изобретения

За иммунитет живых существ отвечают прежде всего лимфатические клетки. К лимфатическим клеткам относятся все клетки, происходящие из одних и тех же гемопоэтических стволовых клеток, которые высвобождаются в периферический кровоток после повторных стадий дифференцировки под действием различных факторов, индуцирующих дифференцировку, включая факторы, называемые иначе ростовыми факторами, имеющиеся в костном мозге или других органах. На основании различий в дифференцировке лимфоциты классифицируются на две больших группы В-клеток и Т-клеток. Считается, что В-клетки обладают способностью продуцировать антитела, тогда как Т-клетки имеют отношение к проявлению антигенности, цитотоксичности и др. свойств. При этом состояние, когда такие клетки по тем или иным причинам подвергаются изменениям, связанным с образованием опухолей, на тех или иных стадиях дифференцировки и начинают бесконтрольно пролиферировать в костном мозге, лимфатической ткани, крови или т. п., относят к опухоли лимфатической ткани.

Благодаря использованию новой технологии, в частности тех преимуществ, которые дает метод применения моноклональных антител против поверхностных антигенов дифференциации, стало возможным идентифицировать начало и/или стадию дифференцировки лимфатических клеток. В этом случае стало возможно не только определить, из каких: Т-клеток или В-клеток, происходят такие опухолевые клетки, но также идентифицировать степень зрелости опухолевых клеток.

Опухоли лимфатической ткани на основе происхождения и степени зрелости опухолевых клеток подразделяют на два крупных класса: опухоли В-клеток и опухоли Т-клеток. В зависимости от степени зрелости опухолевых клеток опухоли В-клеток далее классифицируют на острый В-лимфолейкоз (В-ОЛЛ), хронический В-лимфолейкоз (В-ХЛЛ), пре-В-лимфому, лимфому Буркитта, фолликулярную лимфому, фолликулярную лимфому коры головного мозга, диффузную лимфому и др. С другой стороны, опухоли Т-клеток, в зависимости от степени зрелости опухолевых клеток, классифицируют на острый В-лимфолейкоз (В-ОЛЛ), хронический В-лимфолейкоз (В-ХЛЛ), заболевание, связанное с человеческим вирусом Т-клеток

(АТЛ), лимфому периферических Т-клеток не АТЛ-типа (ПНТЛ) и др. (Zukai Rinso [Gan] (Illustrated Clinical: Cancer), series 17 Leukemia and lymphoma, Takashi Sugimura et al. , Medical View Co. , Ltd. , 1987, B cell tumors, Kiyoshi Takatsuki, Nishimura Shoten, 1991).

Однако, несмотря на последние достижения медицинской технологии, лечение опухолей лимфатических тканей не достигло удовлетворительных результатов. Степень излечения острого лимфолейкоза (ОЛЛ), например, все еще составляет 20% или ниже, а лимфомы на стадии развитого заболевания около 50%, при этом относительно высокая степень излечения В-лимфомы связана с прогрессом множественной терапии. Кроме того, Т-лимфома более склонна к проникновению в другие ткани и характеризуется степенью излечения около 30%, тогда как степень излечения заболевания, связанного с человеческим вирусом Т-клеток (АТЛ), в настоящее время составляет 10%.

Кроме того, Гото с соавт. (Goto, A. et al. ) сообщили о получении моноклонального антитела (антитела к HM1.24) при иммунизации мышей миеломными клетками человека (Blood, 1994, 84, 1922-1930). При введении мыши с трансплантированными клетками миеломы человека антитела к HM1.24, антитело специфически накапливается в опухолевых тканях (Masaakai Kosaka et al. , Nippon Rinsho (Japan Clinical) 1995, 53, 627-635), что дает основание предположить возможность применения антитела к HM1.24 для диагностики локализации опухоли при радиоизотопном мечении, при терапии частицами, такой как радиоиммунотерапия и др. Однако не было известно данных о том, что антитело к HM1.24 используется для лечения опухолей лимфатических тканей.

Сущность изобретения

Применяемый в настоящее время метод лечения опухолей лимфатических тканей включает различные виды химиотерапии, рентгенотерапию, трансплантацию костного мозга и др. Однако, как отмечалось выше, ни один из этих методов не дает удовлетворительных результатов при лечении указанных заболеваний и, в этой связи, все еще имеется потребность в прорыве по созданию лекарственных средств и разработке методов, которые могли бы облегчить течение опухолей лимфатических тканей и удлинить продолжительность жизни пациентов.

В связи с вышесказанным целью настоящего изобретения является разработка лекарственного средства для применения в случае опухолей лимфатических тканей, за исключением миеломы.

Для создания такого лекарственного средства авторы изобретения провели обширные исследования *in vitro*, которые включали анализ методом проточной цитометрии, определение цитотоксической активности, такой как антителообусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC/AOKЦ активности), комплементзависимой цитотоксичности (CDC/КЗЦ цитотоксичности) и др. , исследования *in vivo* по определению противоопухолевого эффекта с

использованием антитела к HM1.24 (Goto et al. Blood, 1994, 84, 1922-1930), а также работы по выделению белкового антигена, с которым специфически связывается антитело к HM1.24. В результате проведенных исследований авторы показали, что на лимфатических опухолях экспрессируется белковый антиген, специфически распознаваемый антителом к HM1.24, при этом указанное антитело к HM1.24 обладает противоопухолевым действием в отношении опухолей лимфатических тканей, что и составило предмет настоящего изобретения.

В связи с этим, настоящее изобретение относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях лимфатических тканей (за исключением миеломы), которое включает в качестве активного ингредиента, антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 1, и которое обладает цитотоксической активностью (перечни последовательностей приведены в конце описания).

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 1, и которое обладает цитотоксической активностью.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента моноклональное антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 1, и которое обладает цитотоксической активностью.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 1, и которое обладает АОКЦ или КЗЦ активностью в качестве цитотоксической активности.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 1, и которое в качестве константной области содержит C<sub>γ</sub> человеческого антитела.

Настоящее изобретение также относится к

лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента химерное антитело или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 1, и которое обладает цитотоксической активностью.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента антитело, которое специфически связывается с эпитопом, распознаваемым антителом к HM1.24.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, применяемому при опухолях Т-клеток, или к лекарственному средству, применяемому при опухолях В-клеток (за исключением миеломы), включающему в качестве активного ингредиента антитело к HM1.24.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу, которое специфически связывается с белком, экспрессируемым в опухолях лимфатических тканей, и которое обладает цитотоксической активностью.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана гистограмма, полученная в результате анализа методом проточной цитометрии указанной В-клеточной линии непрямым методом с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 2 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 3 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 4 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 5 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 6 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 7 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 8 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиного IgG2a.

На фиг. 9 показана гистограмма указанной В-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 10 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 11 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 12 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 13 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 14 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 15 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована, непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 16 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 17 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 18 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 19 показана гистограмма указанной Т-клеточной линии, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 20 показана гистограмма указанной клеточной линии, не относящейся ни к Т-, ни к В-типу, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

На фиг. 21 показана гистограмма указанной клеточной линии, не относящейся ни к Т-, ни к В-типу, которая была

исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

5 На фиг. 22 показана гистограмма указанной клеточной линии, не относящейся ни к Т-, ни к В-типу, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

10 На фиг. 23 показана гистограмма указанной клеточной линии, не относящейся ни к Т-, ни к В-типу, которая была исследована непрямым методом по способу проточной цитометрии с использованием антитела к HM1.24 и контрольного мышиноного IgG2a.

15 На фиг. 24 приведен график, показывающий, что антитело к HM1.24 оказывает цитотоксический эффект на клеточные линии опухолей Т-клеток CCRF-CEM, CCRF-HSB-2 и HPB-MLT зависимым от дозы образом.

20 На фиг. 25 приведен график, показывающий, что антитело к HM1.24 оказывает цитотоксический эффект на клеточные линии опухолей В-клеток EB-3, MC116 и CCRF-SB зависимым от дозы образом.

25 На фиг. 26 приведен график, показывающий, что при введении антитела к HM1.24 опытной группе мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека, наблюдается подавление увеличения объема опухоли в сравнении с контрольной группой животных, которым вводили IgG2a.

30 На фиг. 27 приведен график, показывающий, что при введении антитела к HM1.24 опытной группе мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека, происходит удлинение периода выживания в сравнении с контрольной группой животных, которым вводили IgG2a.

35  
40  
45  
50  
55  
60  
Варианты реализации изобретения  
1. Получение антител  
1-1. Получение гибридомы  
Гибридомы, которые продуцируют антитела, используемые по настоящему изобретению, могут быть сконструированы, в основном, с использованием известных процедур, проведенных ниже. Так, белковый антиген HM1.24 или клетки, которые экспрессируют антиген HM1.24, могут использоваться в качестве сенсibiliзирующего антигена и далее применяться для иммунизации в рамках традиционного метода иммунизации. Полученные иммунные клетки сливают с известными родительскими клетками в ходе обычного процесса слияния клеток и затем проводят скрининг с помощью традиционного метода скрининга для отбора клеток, которые продуцируют моноклональные антитела.

Конкретно, моноклональные антитела могут быть получены следующим способом. Так, например, в качестве клеток, экспрессирующих антиген HM1.24, который представляет собой сенсibiliзирующий антиген для получения антитела, может использоваться множественная миеломная клеточная линия человека KPM2 (нерассмотренная заявка на патент Японии

(Kokai) 7-236475) или KPC-32 (Goto T. et al. , Jpn. J. Clin. Hematol. , 1991, 32, 1400). Альтернативно, в качестве сенсibilизирующего антигена может быть использован белок, имеющий аминокислотную последовательность, указанную ниже в SEQ ID NO: 1, или пептид, или полипептид, содержащие эпитоп, распознаваемый антителом против HM1.24.

В рамках настоящего описания кДНК, которая кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, была вставлена в сайт расщепления XbaI вектора pUC19 с получением плазмиды pRS38-pUC19. E. coli, несущая эту плазмиду, депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положением Будапештского Договора как Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pRS38-pUC19) 5 октября 1993 года Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref. , Япония) как FERM BP-4434 (см. нерассмотренную заявку на патент Японии (Kokai) 7-196694). Фрагмент кДНК, содержащийся в плазмиде pRS38-pUC19, может быть использован для получения пептида или полипептида, содержащих эпитоп, распознаваемый антителом против HM1.24, с использованием методов генной инженерии.

Предпочтительно, млекопитающие, которые иммунизируют сенсibilизирующим антигеном, отбирают с учетом совместимости их с родительской клеткой в процедуре клеточного слияния. В основном они включают, не ограничиваясь ими, грызунов, таких как мыши, крысы, хомячки и др.

Иммунизация животных сенсibilизирующим антигеном проводится с использованием известного метода. Общий метод включает, например, внутривенное или подкожное введение сенсibilизирующего антигена млекопитающему. Специфически, сенсibilизирующий антиген, который был разбавлен и суспендирован в соответствующем количестве фосфатно-буферного раствора (ФБР) или физиологического раствора и др. , смешивают, по желанию, с соответствующим количеством адьюванта Фрейнда. После эмульгирования его предпочтительно вводят млекопитающему несколько раз, каждые 4-21 день. Альтернативно может использоваться подходящий носитель для введения его в момент иммунизации сенсibilизирующим антигеном.

После проведения иммунизации и подтверждения повышения уровня нужного антитела в сыворотке иммунные клетки отбирают из организма млекопитающего и проводят клеточное слияние, в котором предпочтительные иммунные клетки включают, в частности, клетки селезенки.

Миеломные клетки млекопитающих, как пример других родительских клеток, которые подвергают процедуре клеточного слияния с указанными иммунными клетками, включают предпочтительно другие различные клеточные линии, такие как P3X63Ag8.653 (J. Immunol. 1979, 123: 1548-1550), P3X63Ag8U. I (Current Topics in Microbiology and Immunology, 1978,

81: 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. , Eur. J. Immunol. , 1976, 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al. , Cell, 1976, 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al. , Nature, 1978, 276: 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al. , J. Immunol. Methods, 1980, 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I. S. , J. Exp. Med. , 1978, 148: 313-323), R210 (Galfre, G. et al. , Nature, 1979, 277: 131-133) и др.

Процедура клеточного слияния между указанными иммунными клетками и миеломными клетками может быть проведена, по существу, в соответствии с известным методом, таким как описано Мильштейном с соавт. (Kohler, G. and Milstein, C. , Methods Enzymol. , 1981, 73: 3-46) и др.

Более конкретно указанная процедура слияния клеток проводится в обычном питательном бульоне в присутствии, например, ускорителя слияния клеток. В качестве ускорителя слияния клеток используют, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), Сендаи вирус (HVJ) и, кроме того, может быть, по желанию, добавлен адьювант, такой как диметилсульфоксид и др. , для повышения активности процесса слияния.

Предпочтительно, соотношение использованных иммунных клеток и миеломных клеток соответствует, например, 1-10-кратному количеству иммунных клеток в сравнении с миеломными. Примером культуральных сред, которые могут использоваться для осуществления вышеуказанного процесса слияния является среда RPMI1640 и культуральная среда MEM, пригодные для роста указанных миеломных клеточных линий, и традиционная культуральная среда, которые используются для культивирования указанного типа клеток, кроме того, в них могут быть внесены сывороточные добавки, такие как околородная сыворотка теленка (ОСТ, FSC).

В процессе слияния клеток заданное количество указанных иммунных клеток и миеломных клеток тщательно перемешивают в культуральной среде, в которую добавляют раствор ПЭГ, предварительно нагретый примерно до 37°C, например раствор ПЭГ со средним молекулярным весом от примерно 1000 до 6000, в концентрации от 30 до 60% (вес/объем) и перемешивают с получением нужных клеток слияния (гибридом). Затем, посредством повторного последовательного добавления подходящей культуральной среды и центрифугирования с удалением супернатанта, агенты, необходимые для слияния клеток и др. , которые нежелательны для роста гибридом, могут быть удалены.

Селекцию указанных гибридом проводят при культивировании в традиционной селекционной среде, например в культуральной среде НАТ (жидкая культура, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Культивирование в указанной культуральной среде продолжают, в основном, в течение времени, достаточного для гибели клеток, отличных от желательных гибридом (которые не являются клетками слияния), и, как правило, это составляет от нескольких дней до нескольких недель. Обычно применяют традиционный метод серийных разведений, в рамках которого гибридомы, которые продуцируют желательное антитело, отбирают и подвергают моноклональному

клонированию.

Кроме получения указанной гибридомы посредством иммунизации антигеном животного, отличного от человека, можно также сенсibilизировать человеческие лимфоциты in vitro антигеном HM1.24 или клеткам, экспрессирующими антиген HM1.24, а затем полученные сенсibilизированные лимфоциты сливают с миеломными клетками человека, например U266, с получением желательного человеческого антитела, обладающего активностью по связыванию с антигеном HM1.24 или клетками, экспрессирующими антиген HM1.24 (см. публикацию по заявке на патент Японии (Kokoku) 1-59878). Кроме того, трансгенное животное, несущее спектр всех генов антител человека, иммунизируют антигеном, например антигеном HM1.24, или клетками, экспрессирующими антиген HM1.24, с получением желательного гуманизированного антитела по описанному выше методу (см. заявки на Международный патент WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 и WO 96/33735).

Сконструированные таким образом гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело, могут быть подвергнуты субкультивированию в традиционной культуральной среде или могут храниться в течение длительного периода времени в жидком азоте.

Для получения моноклонального антитела от указанной гибридомы используют метод, в рамках которого указанную гибридому культивируют традиционным способом и получают антитела в супернатанте, или метод, в соответствии с которым гибридому вводят для последующего роста в организм млекопитающего, совместимого с указанной гибридомой, и затем антитела получают из асцитов. Первый способ подходит для получения антител высокой степени чистоты, тогда как последний пригоден для крупномасштабного процесса получения антител.

В частности, гибридома, продуцирующая антитело против HM1.24, может быть получена с использованием метода Гото (Goto, T. , et al. , Blood, 1994, 84: 1922-1930). Она также может быть получена с помощью метода, в рамках которого гибридому, продуцирующую антитело против HM1.24, которая была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как FERM BP-5233 14 сентября 1995 года Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref. , Япония) инъецируют внутрибрюшинно мышам линии BALB/C (производство CLEA, Япония) с получением асцитов, из которых выделяют и очищают антитела против HM1.24, или используется метод, в соответствии с которым указанную гибридому культивируют в подходящей культуральной среде, такой как RPMI1640, содержащей 10% околплодной сыворотки и 5% BM-Condimed H1 (производство Boehringer Mannheim), среде SFM для выращивания гибридом (производство GIBCO-BRL), среде PFHM-II

(производство GIBCO-BRL) и др. , и в этом случае антитело против HM1.24 может быть выделено и очищено из супернатанта.

#### 1-2. Рекombинантное антитело

5 Рекombинантное антитело, получаемое в соответствии с технологией манипулирования рекомбинантными генами, в рамках которой ген для антитела клонируют из гибридомы и интегрируют в соответствующий вектор, который затем вводят в организм хозяина, может использоваться по настоящему изобретению как моноклональное антитело (см. , например, Carl, A. K. , Borrebaeck, James, W. Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, опубликованная в Великобритании, Macmillan Publishers LTD. , 1990).

10 В частности, мРНК, кодирующую вариabельную область (V-область) желательного антитела, выделяют из гибридомы, продуцирующей антитело. Для выделения мРНК получают общую РНК с использованием, например, известного метода, такого как метод ультрацентрифугирования в гуанидине (Chirgwin, J. M et al. , Biochemistry, 1979, 18: 5294-5299), the AGPC method (Chomczynski, P. et al. , Analytical Biochemistry, 1987, 162: 156-159) и затем выделяют мРНК из общей массы РНК с использованием набора для очистки мРНК (производство Pharmacia) и др. Альтернативно, мРНК можно непосредственно получить с использованием набора Quick Prep для очистки мРНК производства Pharmacia.

15 кДНК к V-области антитела может быть синтезирована из полученной указанным способом мРНК с использованием обратной транскриптазы. кДНК может быть синтезирована с использованием включающего обратную транскриптазу набора для синтеза кДНК AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit и др. Альтернативно, для синтеза и амплификации кДНК может быть использован набор 5'-Ampli Finder Race Kit (производство Clontech) и метод 5'-Race (Frohman, M. A. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85: 8998-9002; Belyavsky, A. et al. , Nucleic Acids Res. , 1989, 17: 2919-2932), в рамках которой используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Желательный фрагмент ДНК очищают из полученного продукта ПЦР и далее он может быть лигирован с векторной ДНК. Кроме того, на его основе конструируют рекомбинантный вектор и вводят его в E. coli и далее до отбора колоний для получения желательного рекомбинантного вектора. Нуклеотидная последовательность заданной ДНК может быть подтверждена с помощью известного метода, такого как дидезоксиметод.

20 При получении ДНК, кодирующей V-область желательного антитела, ее можно лигировать с ДНК, кодирующей константную область (C-область) желательного антитела, и затем полученный продукт интегрируют в вектор экспрессии. Альтернативно, ДНК, кодирующая V-область антитела, может быть интегрирована в вектор экспрессии, который уже содержит ДНК, кодирующую C-область антитела.

25 Для продуцирования антитела, применяемого по настоящему изобретению, ген антитела интегрируют, как будет описано ниже, в вектор экспрессии так, чтобы экспрессия проходила под контролем

регуляторной области экспрессии, например энхансера и/или промотора. Впоследствии вектор экспрессии может быть принесен трансформацией в клетку хозяина, где антитело может экспрессироваться.

### 1-3. Измененное антитело

В соответствии с настоящим изобретением искусственно измененное рекомбинантное антитело, такое как химерное антитело и гуманизованное антитело, может использоваться для цели снижения гетерологичной антигенности в отношении человека. Такие измененные антитела могут быть получены с использованием известных методов.

Химерное антитело может быть получено при лигировании полученной описанным выше способом ДНК, кодирующей V-область антитела, с ДНК, кодирующей C-область антитела человека, и затем полученный продукт встраивают в вектор экспрессии и вводят в организм хозяина для продуцирования в нем антитела (см. заявку на Европейский патент EP 125023 и заявку на Международный патент WO 96/02576). Химерное антитело, применяемое по настоящему изобретению, может быть получено с использованием известного метода.

Например, *E. coli*, несущая плазмиду, которая содержит ДНК, кодирующую L-цепь V-области или H-цепь V-области химерного антитела против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-gk) и *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ ), соответственно, 29 августа 1996 года Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония) как FERM BP-5646 и FERM BP-5644 соответственно (см. заявку на патент Японии 9-271536).

Гуманизованное антитело, которое также называют восстановленным человеческим антителом, получают при трансплантации гипервариабельного участка (ГВУ) антитела млекопитающего, отличного от человека, например антитела мыши, в ГВУ человеческого антитела. В целом, технология, основанная на получении рекомбинантной ДНК, для продуцирования таких антител также известна (см. заявку на Европейский патент EP 125023 и заявку на Международный патент WO 96/02576).

Конкретно, методом ПЦР синтезируют последовательность ДНК, которая должна подходить для лигирования ГВУ мышинного антитела с каркасной областью (КО) человеческого антитела с использованием нескольких раздельных олигонуклеотидов, несущих на концах разрезы, перекрывающиеся один с другим. Полученную таким образом ДНК лигируют с ДНК, кодирующей C-область человеческого антитела, и затем встраивают полученный продукт в вектор экспрессии, который затем вводят в организм хозяина для продуцирования антител (см. заявку на Европейский патент EP 239400 и заявку на Международный патент WO 96/02576).

Отбирают КО человеческих антител, сшитые через ГВУ так, чтобы участки, определяющие комплементарность, образовывали сайт, благоприятный для связывания с антигеном. При желании, аминокислоты в каркасных областях вариабельной области антитела могут быть замещены так, чтобы гипервариабельный участок восстановленного человеческого антитела мог образовывать подходящий сайт для связывания с антигеном (Sato, K. et al., *Cancer Res.*, 1993, 53: 851-856).

Например, *E. coli*, несущая плазмиду, которая содержит ДНК, кодирующую вариант а (SEQ ID NO: 2) L-цепи V-области и вариант г (SEQ ID NO: 2) L-цепи V-области гуманизованного антитела против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gk) и *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-PVHr-AHM-gyl) соответственно 29 августа 1996 года Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония) как FERM BP-5645 и FERM BP-5643, соответственно (см. заявку на патент Японии 9-271536). Кроме того, *E. coli*, несущая плазмиду, которая содержит ДНК, кодирующую вариант s (SEQ ID NO: 4) H-цепи V-области гуманизованного антитела против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-gyl) 29 сентября 1997 года Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония) как FERM BP-6127 (заявка на патент Японии 9-271536).

В случае химерного или гуманизованного антитела используют C-область человеческого антитела и наиболее предпочтительно в качестве константной области человеческого антитела может быть использована C $\gamma$ , такая как C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 и C $\gamma$ 4. Среди них антитела, содержащие C $\gamma$ 1 и C $\gamma$ 3, обладают мощной цитотоксической активностью, т. е. АОКЦ и КЗЦ активностью, и в этой связи они предпочтительно используются по настоящему изобретению.

Химерное антитело включает вариабельную область антитела, происходящего из млекопитающего, отличного от человека, и C-область, происходящую из человеческого антитела, при этом гуманизованное антитело включает гипервариабельные участки антитела, происходящего из млекопитающего, отличного от человека, каркасные области (КО) и C-область антитела, происходящие из человеческого антитела. В соответствии с этим их антигенность в организме человека снижается, так что они могут быть использованы в качестве активного ингредиента лекарственных средств по настоящему изобретению.

Предпочтительный вариант



гуманизированного антитела для использования по настоящему изобретению включает гуманизированное антитело против HM1.24 (см. заявку на патент Японии 9-271536). Предпочтительный вариант L-цепи V-области гуманизированного антитела против HM1.24 включает тот, в котором имеется аминокислотная последовательность, кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2. Предпочтительный вариант H-цепи V-области гуманизированного антитела против HM1.24 включает тот из них, который имеет аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью оснований, указанной в SEQ ID NO: 3 или 4.

1-4. Экспрессия и продуцирование

Гены для антител, сконструированных как указано выше, могут экспрессироваться, в результате чего с использованием известного метода может быть получено антитело. В случае использования клеток млекопитающих экспрессия может проводиться с использованием вектора экспрессии, содержащего обычно применяемый промотор, ген антитела, который должен экспрессироваться, и ДНК, в которой поли A сигнал был оперативно смит на 3' конце по направлению репликации, или вектор, содержащий указанную ДНК. Примеры промотора/энхансера включают ранний промотор/энхансер цитомегаловируса человека.

Кроме того, в качестве промотора-энхансера, которые могут использоваться для экспрессии антитела по настоящему изобретению, могут найти применение вирусные промоторы/энхансеры, такие как промоторы/энхансеры ретровируса, вируса полиомы, аденовируса и вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 (SV40), а также промоторы/энхансеры, полученные из клеток млекопитающих, такие как человеческий фактор элонгации 1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ).

Так например, экспрессия может быть легко осуществлена по методу Миллигана с соавт. (Milligan et al. , Nature, 1979, 277, 108) в рамках которого используется промотор/энхансер SV40, или по методу Мицushima с соавт. (Mizushima et al. , Nucleic Acids Res. , 1990, 18, 5322), в котором используется промотор/энхансер HEF1 $\alpha$ .

В случае E. coli экспрессия может быть осуществлена при оперативном связывании обычно используемого промотора, сигнальной последовательности для секреции антитела и гена антитела, который подлежит экспрессии, с последующей его экспрессией. В качестве промотора можно, например, упомянуть промотор lacZ и промотор agaB. В случае использования промотора lacZ можно использовать метод Варда с соавт. (Ward et al. , Nature, 1998, 341, 544-546; Faseb J. 1992, 6, 2422-2427), а в случае использования промотора agaB может найти применение метод Беттера с соавт. (Better et al. , Science, 1988, 240, 1041-1043).

В качестве сигнальной последовательности для секреции антитела при продуцировании его в периплазме E. coli может использоваться сигнальная последовательность pelB (Lei, S. P. et al. , J. Bacteriol. , 1987, 169, 4379). После

отделения продуцированного в периплазме антитела структура антитела подвергается складыванию перед использованием (см. , например, WO 96/30394).

5 В качестве сайта начала репликации могут быть использованы такие участки, которые получают из SV40, вируса полиомы, аденовируса, вируса, бычьей папилломы (BPV) и др. Кроме того, для амплификации генных копий в хозяйской клеточной системе вектор экспрессии может включать в качестве селектируемого маркера ген аминокликозидтрансферазы (APH), ген тимидинкиназы (TK) и ген ксантингуанинфосфорибозилтрансферазы E. coli (EcoGpt), ген дигидрофолатредуктазы (dhfr) и др.

10 Для продуцирования антитела, используемого по настоящему изобретению, можно применять любую систему продуцирования. Система продуцирования антитела может основываться на системе продуцирования in vitro и in vivo. В качестве системы продуцирования in vitro может быть упомянута система продуцирования, в которой используются эукариотические клетки, и система продуцирования, в которой используются прокариотические клетки.

15 Системы продуцирования на основе эукариотических клеток включают клетки животных, растительные клетки и грибные клетки. Известные клетки животных включают (1) клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки COS, миеломные клетки, почечные клетки детенышей хомячков (ВНК), HeLa клетки и Vero клетки, (2) клетки земноводных, такие как ооциты Xenopus или (3) клетки насекомых, такие как sf9, sf21 и Tn5. Известные растительные клетки включают, например, те из них, которые происходят из рода Nicotiana и более конкретно клетки, происходящие из Nicotiana tabacum, которые образуют каллусные культуры. Известные грибные культуры включают дрожжи, такие как представители рода Saccharomyces, более конкретно Saccharomyces cereviceae или нитевидные грибы, такие как представители рода Aspergillus и более конкретно Aspergillus niger.

20 Системы продуцирования на основе прокариотических клеток включают бактериальные клетки. Известные бактериальные клетки включают Escherichia coli (E. coli) и Bacillus subtilis.

25 Антитело может быть получено при введении через процесс трансформации гена желательного антитела в эти клетки и последующем культивировании трансформированных клеток in vitro. Культивирование осуществляют известными методами. Так например, могут использоваться культуральные среды, такие как DMEM, MEM, RPMI1640, в которые могут вноситься сывороточные добавки, такие как околплодная сыворотка теленка (ОСТ). Кроме того, антитела могут продуцироваться in vivo при имплантации клеток, в которые был введен ген антитела, в брюшной полости животного и др.

30 В качестве других систем продуцирования можно отметить те из них, в которых используются животные, и те из них, в которых используются растения. Системы продуцирования на основе животных

организмов включают клетки млекопитающих и насекомых.

В качестве млекопитающих могут использоваться козы, свиньи, овцы, мыши и крупный рогатый скот (Vicki Glaser, Spectrum Biotechnology Application, 1993). В качестве насекомых может использоваться тутовый шелкопряд.

В случае использования растений может найти применение растение табака.

Ген антитела вводят в организм указанных животных и растений, и в таких животных и растениях продуцируются антитела. Так например, ген антитела вводят в середину гена, кодирующего белок, который продуцируется в молоке, такой как козий  $\beta$ -казеин, для получения слитых генов. Фрагменты ДНК, содержащие слитый ген, в который был вставлен ген антитела, инъецируют в козий эмбрион и затем эмбрион вводят в организм козы. Желательное антитело получают из молока, продуцируемого трансгенной козой, которой стала та коза, которой ввели указанный эмбрион, или ее потомство. Для того чтобы повысить количество молока, содержащего желательное антитело, продуцируемое трансгенной козой, такой трансгенной козе, в случае приемлемости, могут вводиться гормоны (Ebert K. M. et al. , Bio/Technology, 1994, 12, 699-702).

В случае использования тутового шелкопряда для инфицирования его используют бакуловирус, в который встроен ген желательного антитела, при этом желательное антитело может быть получено из жидкостей тела тутового шелкопряда (Susumu, M. et al. , Nature, 1985, 315, 592-594). А в случае использования растений табака ген желательного антитела вставляют в подходящий для растений вектор экспрессии, например pMON 530, и затем вектор вводят в бактерию, такую как *Agrobacterium tumefaciens*. Указанную бактерию затем используют для инфицирования растений табака, таких как *Nicotiana tabacum*, с получением желательного антитела из листьев табака (Julian, K. -C. Ma et al. , Eur. J. Immunol. , 1994, 24, 131-138).

При продуцировании антитела в системах продукции *in vitro* и *in vivo*, как указано выше, ДНК, кодирующая тяжелую цепь (H-цепь) или легкую цепь (L-цепь) антитела, может быть отдельно введена в вектор экспрессии, которыми потом одновременно трансформируют хозяйские клетки, в другом случае ДНК, кодирующие H-цепь и L-цепь, могут быть интегрированы в едином векторе экспрессии и использованы для трансформации хозяйского организма (см. заявку на Международный патент WO 94/11523).

Антитело, продуцируемое по описанному выше методу, может быть связано с различными молекулами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), для получения с целью последующего использования модифицированного антитела. "Антитело" в контексте настоящего описания включает такие модифицированные антитела. Для того чтобы получить такое модифицированное антитело, антитело подвергают химической модификации. Такие методы уже имеются на достигнутом уровне техники.

## 2. Разделение и очистка антител

2-1. Разделение и очистка антитела  
Антитела, продуцируемые и экспрессируемые, как было описано выше, могут быть отделены от внутренней или внешней среды клетки или выделены из организма хозяина и далее они могут быть очищены до гомогенности. Выделение и очистка антитела с целью последующего использования по настоящему изобретению могут быть осуществлены с использованием афинной хроматографии. В качестве колонки, используемой в такой афинной хроматографии, может применяться колонка с белком А и колонка с белком G. Примерами носителей, применяемых в колонке А, являются Hyper D. , Poros, Sepharose F. F. и др.

Альтернативно, без всяких ограничений могут использоваться традиционные методы выделения и очистки белков. Выделение и очистка антитела для использования его далее по настоящему изобретению могут быть проведены при связывании надлежащим способом в процессе хроматографирования, отличном от указанной выше афинной хроматографии, при фильтровании, ультрафильтровании, высаливании, диализе и др. Хроматография включает, например, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию и др. Такие виды хроматографии могут быть введены в систему ВЭЖХ. Альтернативно, может быть использована хроматография с обращением фаз.

2-2. Определение концентрации антитела  
Концентрация антитела, полученного в указанном выше разделе 2-1, может быть определена измерением поглощения или при помощи иммуноферментного твердофазного анализа (ИФТФА) и др. Так, при использовании для измерения уровня поглощения, антитело по настоящему изобретению или образец, содержащий антитело, разбавляют соответствующим образом ФБР(-) и затем измеряют поглощение при 280 нм, после чего проводят расчет с использованием коэффициента поглощения (оптической плотности), равного 1,35, при концентрации 1 мг/мл. При использовании метода ИФТФА измерения проводят следующим образом. 100 мкл козьего против человеческого IgG (производство Bio Source) разбавляют до концентрации 1 мкг/мл в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 9,6, вносят на 96-гнездную микротитрационную планшету (производство Nunc) и инкубируют в течение ночи при температуре 4°C для иммобилизации антитела.

После блокирования 100 мкл каждого разбавленного соответствующим образом антитела по настоящему изобретению или образец, содержащий антитело, или 100 мкл человеческого IgG известной концентрации, взятого в качестве стандарта, добавляют в ячейку и проводят инкубирование при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания добавляют 100 мкл разбавленного в 5000 раз антитела против IgG человека, меченного щелочной фосфатазой (производство Bio Source), и проводят инкубацию при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания добавляют субстратный раствор и инкубируют и затем, после измерения поглощения при 405 нм, с использованием Microplate reader, модель

3550 (производство Bio-Rad), проводят подсчет концентрации желательного антитела.

### 3. Анализ методом проточной цитометрии

Реакционная способность антител, используемых по настоящему изобретению в отношении опухолевых клеток лимфатической ткани, может быть исследована методом проточной цитометрии. Используемые клетки могут представлять собой установленные клеточные линии или свежeweделенные клетки. В качестве установленных клеточных линий может использоваться, например, линия Т-клеток RPMI 8402 (ATCC CRL-1994), CCRF-CEM (ATCC CCL-119), полученная из клеток при остром лимфобластном лейкозе, HPB-ALL (FCCH1018), полученная из клеток при остром лимфолейкозе, HPB-MLT (FCCH1019), полученная из клеток при Т-лимфоме, JM (FCCH1023), полученная из клеток при остром лимфолейкозе, MOLT-4 (ATCC CRL-1582), полученный из клеток при остром лимфобластном лейкозе, Jurkat (FCCH1024), полученная из клеток при остром лимфолейкозе, CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), полученная из клеток при остром лимфобластном лейкозе, MT-1 (FCCH1043), полученная из клеток при заболевании, связанном с человеческим вирусом Т-клеток, КТ-3, полученная из клеток при лимфоме Леннерта (Shimizu, S. et al. , Blood, 1988, 71, 196-203) и др. ; а в качестве линии В-клеток линия (ATCC TIB-190), трансформированная вирусом EB, положительная на вирус EB линия В-клеток SKW 6.4 (ATCC TIB-215), MC116 (ATCC CRL-1649), полученная из клеток с В-лимфомой, CCRF-SB (ATCC CCL-120), полученная из клеток при остром лимфобластном лейкозе, линия В-клеток RPMI 6410 (FCCH6047), полученная от пациента с острой миелоцитарной лейкемией, Daudi (ATCC CCL-213), полученная из клеток при лимфоме Буркитта, EB-3 (ATCC CCL-85), полученная из клеток при лимфоме Буркитта, Jijoue (ATCC CCL-87), полученная из клеток при лимфоме Буркитта, Raji (ATCC CCL-86), полученная из клеток при лимфоме Буркитта, и в качестве клеточной линии, не относящейся ни к Т-, ни к В-типу, линия HL-60 (ATCC CCL-240), полученная из клеток при острой миелоцитарной лейкемии, THP-1 (ATCC TIB-202), полученная из клеток при острой моноцитарной лейкемии, U-937 (ATCC CRL-1593), полученная из клеток при гистиоцитарной лимфоме, K-562 (ATCC CCL-243), полученная из клеток при хронической миелоцитарной лейкемии и др.

После промывания вышеуказанных клеток в ФБР(-) к ним добавляют 100 мкл антитела или контрольного антитела, разбавленного до концентрации 25 мкг/мл в FACS буфере ФБР(-), содержащем 2% околплодной сыворотки теленка и 0,1% азида натрия, и затем инкубируют полученную смесь на льду в течение 30 минут. После промывания в FACS буфере добавляют 100 мкл противомышиного козьего антитела, меченного ФИТЦ (GAM, производство Becton Dickinson), в концентрации 25 мкг/мл и затем инкубируют смесь на льду в течение 30 минут. После промывания в FACS буфере клетки суспендируют в 600 мкл или 1 мл FACS буфера и измеряют интенсивность флуоресценции всех клеток с помощью прибора FACScan (производство Becton

Dickinson).

На основании полученного для каждого типа клеток значения интенсивности флуоресценции вычисляется реакционная способность антитела, с точки зрения использования по настоящему изобретению, с каждым видом клеток. Так, на основании значения интенсивности флуоресценции для каждого типа клеток можно определить, экспрессируется ли антиген HM1.24 на клетках каждого вида (позитивных или негативных) или может быть определена степень экспрессии. Данные по наличию и интенсивности экспрессии антигена HM1.24 в опухолевых клетках лимфатической ткани приведены ниже в примере 2.2, посвященном анализу метода проточной цитометрии.

Опухолевые клетки при опухолях лимфатической ткани, которые могут стать мишенью для лечения по настоящему изобретению, экспрессируют антиген HM1.24. Более конкретно, опухолевые клетки в опухоли лимфатической ткани предпочтительно относятся к тем клеткам, которые являются позитивными в отношении антигена HM1.24 и в которых процент проявления указанного антигена не ниже 5%. Более конкретно, опухолевые клетки в опухолях лимфатической ткани предпочтительно представляют собой те из них, в которых позитивный процент проявления антигена HM1.24 составляет 20% или выше.

Более конкретно, опухолевые клетки в опухолях лимфатической ткани представляют собой предпочтительно те из них, в которых позитивный процент проявления антигена HM1.24 составляет 50% или выше. Более конкретно, опухолевые клетки в опухолях лимфатической ткани предпочтительно представляют собой те из них, в которых позитивный процент проявления антигена HM1.24 составляет 80% или выше.

#### 4. Цитотоксическая активность

##### 4-1. Измерение КЗЦ активности

Антитело, применяемое по настоящему изобретению, представляет собой такое антитело, которое обладает, например, КЗЦ активностью в качестве цитотоксической активности.

КЗЦ активность лекарственного средства, применяемого при опухолях лимфатических тканей по настоящему изобретению, может быть измерена следующим образом. Вначале готовят клетки-мишени в концентрации  $4 \cdot 10^5$  клеток/мл в соответствующей среде, например в среде RPMI1640, содержащей 10% околплодной сыворотки теленка (производство Gibco-BRL). В качестве клеток-мишеней могут быть использованы CCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), HPB-MLT (FCCH1019), EB-3 (ATCC CCL-85), MC116 (ATCC CRL-1649), CCRF-SB (ATCC CCL-120), K-562 (ATCC CCL-243) и др. Пятьдесят мкл указанных клеток вносят на 96-гнездную микротитрационную планшету с плоским дном (производство Falcon) и планшету инкубируют в инкубаторе с подачей CO<sub>2</sub> при температуре 37°C в течение ночи.

Затем добавляют антитело, КЗЦ активность которого предстоит измерить, инкубируют все в течение 60 минут и затем добавляют соответствующим образом разбавленный комплемент, например

комплемент детеныша кролика (Baby Rabbit Complement, производство Cedarlane) и проводят инкубацию в течение 2 часов. Затем к каждой ячейке добавляют 10 мкл Alamar Bule (производство Bio Source) и проводят инкубацию в течение 4-х часов и затем измеряют интенсивность флуоресценции (длина волны возбуждения 530 нм, длина волны эмиссии 590 нм) с использованием системы измерения флуоресценции CytoFluor 2350 (производство Millipor). Цитотоксическая активность (%) может быть вычислена по формуле  $(A-C)/(B-C) \cdot 100$ , где А обозначает интенсивность флуоресценции при инкубации в присутствии антитела, В обозначает интенсивность флуоресценции при инкубации в среде, не содержащей антитело, и С представляет собой интенсивность флуоресценции ячейки, не содержащей клеток.

#### 4-2. Измерение АОКЦ активности

Антитело, используемое по настоящему изобретению, представляет собой такое антитело, которое обладает, например, АОКЦ активностью в качестве цитотоксической активности.

АОКЦ активность лекарственного средства, используемого при лечении опухолей лимфатических тканей по настоящему изобретению, может быть измерена следующим образом. Вначале, моноядерные клетки выделяют в качестве эффекторных клеток из периферической крови человека или из костного мозга при гравитационном центрифугировании. В качестве клеток-мишеней берут CCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), HPB-MLT (FCCH1019), EB-3 (ATCC CCL-85), MC116 (ATCC CRL-1649), CCRF-SB (ATCC CCL-120), K-562 (ATCC CCL-243) или др., которые метят  $^{51}\text{Cr}$  с получением препаратов В-клеток-мишеней. Затем к меченым клеткам-мишеням добавляют антитело, активность которого предстоит измерить, и проводят инкубацию. Эффекторные клетки в подходящем соотношении добавляют затем к клеткам-мишеням и проводят инкубацию.

После инкубации собирают супернатант и измеряют радиоактивность с помощью гамма-счетчика, при этом для измерения максимума высвобожденной радиоактивности может быть использован 1% NP-40. Цитотоксическую активность (%) вычисляют по формуле  $(A-C)/(B-C) \cdot 100$ , где А обозначает радиоактивность (имп/мин), высвобождаемую в присутствии антитела, В обозначает радиоактивность (имп/мин), высвобождаемую при наличии NP-40, и С обозначает радиоактивность (имп/мин), высвобождаемую в среде, не содержащей антитело.

#### 4-3. Повышение цитотоксической активности

Для достижения цитотоксической активности, такой как АОКЦ активность и КЗЦ активность, предпочтительно использовать  $\text{C}\gamma$ , в частности  $\text{C}\gamma 1$  и  $\text{C}\gamma 3$ , в качестве константной области (С-области) антитела человека. Кроме того, усиленная АОКЦ активность или КЗЦ активность может быть индуцирована при добавлении, изменении или модификации части аминокислот в С-области антитела.

В качестве примера можно указать на конструирование IgM-подобного полимера IgG

при замещении аминокислот (Smith, R. I. F. and Morrison, S. L., Bio/Technology, 1994, 12, 683-688), конструирование IgM-подобного полимера IgG при добавлении аминокислот (Smith, R. I. F. et al., J. Immunology, 1995, 154, 2226-2236), экспрессию тандемно-лигированного гена, кодирующего L-цепь (Shuford, W., et al., Science, 1991, 252, 724-727), димеризацию IgG при замещении аминокислот (Caron, P. C. et al., J. Exp. Med., 1992, 176, 1191-1195; Shopes, B., J. Immunology, 1992, 148, 2918-2922), димеризацию IgG при химической модификации (Wolff, E. A. et al., Cancer Res., 1993, 53, 2560-2565) и введение эффекторной функции при изменении аминокислот(ы) в шарнирной области антитела (Norderhaug, L., et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21, 2379-2384) и др. Все эти процедуры могут быть осуществлены с применением сайт-специфичного мутагенеза с использованием праймера, при добавлении нуклеотидной последовательности в сайте расщепления рестрикционных ферментов при использовании химических модифицирующих веществ, которые создают ковалентную связь.

#### 5. Подтверждение терапевтического эффекта

Терапевтический эффект лекарственного средства, используемого по настоящему изобретению, при опухолях лимфатических тканей может быть подтвержден при введении антитела, используемого по настоящему изобретению, животным, которым трансплантировали клетки опухоли лимфатических тканей с последующей оценкой противоопухолевого эффекта средства на животных.

В качестве лимфатических опухолевых клеток, вводимых животному, могут использоваться установленные клеточные линии или свежeweделенные клетки. В качестве установленной клеточной линии может быть использована CCRF-CEM (ATCC CCL-119), HPB-MLT (FCCH1019), MOLT-4 (ATCC CRL-1582), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1) и др. в качестве Т-клеточной линии и CESS (ATCC TIB-190), SKW 6.4 (ATCC TIB-215), CCRF-SB (ATCC CCL-120), RPMI 6410 (FCCH6047), EB-3 (ATCC CCL-85) и др. в качестве В-клеточной линии.

Животные, которым провели трансплантацию, предпочтительно относятся к тем, у которых иммунологические функции снижены или отсутствуют. Например, могут использоваться мыши, лишенные волосяного покрова, мыши SCID, бежевые мыши, крысы, лишенные волосяного покрова, и др. Определенный противоопухолевый эффект может быть подтвержден измерением объема и веса опухолей или на основании длительности выживания животных и др.

Как показано в приведенных ниже примерах, введение антитела против HM1.24 приводит к подавлению роста объема опухоли и, кроме того, к увеличению периода выживаемости мышей с трансплантированной опухолью. Эти факты указывают на то, что антитело против HM1.24 обладает противоопухолевым воздействием на опухоли лимфатической ткани.

#### 6. Способ введения и фармацевтические препараты

Лекарственные средства для лечения опухолей лимфатических тканей по

настоящему изобретению могут быть введены либо системно, либо местно, парентеральным способом, например путем внутривенной инъекции, такой как капельная инфузия, внутримышечной инъекции, внутривнутрибрюшинной инъекции и подкожной инъекции. Метод введения может быть выбран по показанию в зависимости от возраста и состояния пациента. Эффективную дозировку выбирают в диапазоне от 0,01 мг до 100 мг на килограмм веса тела на введение. Альтернативно, может быть выбрана дозировка, в диапазоне от 1 до 1000 мг, предпочтительно от 5 до 50 мг на пациента.

Лекарственные средства для лечения опухолей лимфатической ткани по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые носители или добавки, в зависимости от применяемого способа введения. Примеры таких носителей или добавок включают воду, фармацевтически приемлемый органический растворитель, коллаген, поливиниловый спирт, поливинил-пирролидон, карбоксиполивиниловый полимер, натрий-карбоксиметил-целлюлозу, натриевую соль полиакриловой кислоты, альгинат натрия, водорастворимый декстран, натрий-карбоксиметил крахмал, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую камедь, аравийскую камедь, казеин, желатин, агар, диглицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), маннит, сорбит, лактозу, фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество и др. Используемые добавки выбирают из указанных средств или их сочетаний, не ограничиваясь ими, в зависимости от формы применяемой дозировки.

Заболевания, подлежащие лечению по способу настоящего изобретения, представляют собой опухоли лимфатической ткани (за исключением миеломы), которые несут антиген на опухолевых клетках и с которыми связывается антитело, применяемое по настоящему изобретению. В качестве конкретных заболеваний такого рода можно отметить острый В-лимфолейкоз (В-ОЛЛ), хронический В-лимфолейкоз (В-ХЛЛ), пре-В-лимфому, лимфому Буркитта, фолликулярную лимфому, фолликулярную лимфому коры головного мозга, диффузную лимфому, острый Т-лимфолейкоз (Т-ОЛЛ), хронический Т-лимфолейкоз (Т-ХЛЛ), заболевание, связанное с человеческим вирусом Т-клеток (АТЛ), периферическую Т-лимфому, не связанную с человеческим вирусом Т-клеток (ПНТЛ) и др. Лекарственные средства по настоящему изобретению используются в качестве лекарственных средств при лечении опухолей лимфатических тканей.

Примеры

Приведенные ниже примеры служат для более детального описания настоящего изобретения. Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается указанными примерами никоим образом.

Пример 1. Конструирование антитела против HM1.24

1. Получение мышинных асцитов, содержащих антитело против HM1.24

Получают гибридомы, продуцирующие

антитела против HM1.24 в соответствии с методом Гото с соавт. (Goto, T. et al. , Blood, 1994, 84, 1922-1930).

Мышам линии BALB/c (получаемые от фирмы CLEA, Япония), которым предварительно ввели внутривнутрибрюшинно 500 мкл 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (производство Wako Pure Chemical Industries, Ltd. ), за 11 и за 3 дня до эксперимента инъецируют внутривнутрибрюшинно

$5 \cdot 10^6$  гибридных клеток. Начиная с 10 дня после инъекции гибридных клеток, собирают асциты, которые накопились в брюшной полости мыши, с помощью постоянной иглы 19 размера Лекрусас (производство Medikit). Собранные асциты центрифугируют дважды со скоростью 1000 и 3000 об/мин с использованием низкоскоростной центрифуги RLX-131 (производство Tomy Seiko) для удаления гибридом и контаминантов, таких как клетки крови и др.

2. Очистка антитела против HM1.24 из мышинных асцитов

Очистку антитела против HM1.24 из указанных выше мышинных асцитов проводят следующим образом. После добавления равного количества ФБР(-) к мышинным асцитам смесь фильтруют с использованием волоконного фильтра Mediaprep (производство Millipore) и затем подвергают афинной очистке с использованием высокоскоростного прибора для очистки антител ConSep LC100 (производство Millipore) и колонки Hyper D Protein A (колонка объемом 20 мл производства Nihon Gaisi), ФБР(-) в качестве адсорбционного буфера и 0,1 М натрий-цитратного буфера (pH 4) в качестве элюирующего буфера, в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Элюируемые фракции сразу же доводят до значения pH 7,4 при добавлении 1 М Трис-HCl (pH 8,0), и затем подвергают концентрированию и замещают буфер на ФБР(-) с использованием ультрафильтрационного концентратора Centriprep 10, с последующим стерильным фильтрованием через мембранный филар Millex-GV (производство Millipore) с размером пор 0,22 мкм с получением очищенного антитела против HM1.24.

3. Определение концентрации антитела

Концентрацию очищенного антитела определяют при измерении поглощения. Так, очищенное антитело разбавляют в ФБР(-), измеряют поглощение при 280 нм и вычисляют концентрацию с использованием коэффициента пересчета, составляющего: 1,35 единиц оптической плотности = 1 мг/мл.

Пример 2. Изучение реакционной способности антитела против HM1.24 с лимфатическими опухолевыми клетками

1. Очистка контрольного мышинного IgG2a

Контрольный мышинный IgG2a очищают следующим образом. Коммерчески доступный IgG2a (KAPPA) (UpC 10) из асцитов (производство Cappel) растворяют в очищенной воде и ФБР(-). Раствор фильтруют с использованием мембранного фильтра Acrodisc (производство Gelman Sciences) с размером пор 0,2 мкм, и затем очищают афинным способом с помощью высокоскоростного прибора для очистки антител ConSep LC 100 (производство Millipore), колонки Hyper D Protein A (колонка объемом 20 мл, производство Nihon

Gaisi), ФБР(-) в качестве адсорбционного буфера и 0,1 М натрий-цитратного буфера (pH 4) в качестве элюирующего буфера, в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Элюируемые фракции сразу же доводят до значения pH 7,4 при добавлении 1 М Трис-HCl (pH 8,0) и затем подвергают концентрированию и замещают буфером ФБР(-) с использованием центрифужного ультрафильтрационного концентратора Centriprep 10 с последующим стерильным фильтрованием через мембранный фильтр Millex GV (производство Millipore) с размером пор 0,22 мкм с получением очищенного контрольного мышиного IgG2a.

Определение концентрации контрольного мышиного IgG2a проводят в соответствии с процедурой, приведенной ранее в разделе 3. Определение концентрации антитела.

## 2. Анализ по методу проточной цитометрии

Реакционную способность антитела против HM1.24 с лимфатическими опухолевыми клетками исследуют методом проточной цитометрии. После промывания в ФБР(-) Т-клеточной линии RPMI 8402 (ATCC CRL-1995), CCRF-CEM (ATCC CRL-119), полученной из клеток при остром лимфобластном лейкозе HPB-ALL (FCCH1018), полученной из клеток при остром лимфолейкозе, HPB-MLT (FCCH1019), полученной из клеток при Т-лимфоме, JM (FCCH1023), полученной из клеток при остром лимфолейкозе, MOLT-4 (ATCC CRL-1582), полученной из клеток при остром лимфобластном лейкозе, Jurkat (FCCH1024), полученной из клеток при остром лимфолейкозе, CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), полученной из клеток при остром лимфобластном лейкозе, MT-1 (FCCH1043), полученной из клеток при заболевании, связанном с человеческим вирусом Т-клеток, и КТ-3, полученной из клеток при лимфоме Леннерта (Shimizu, S. et al. , Blood, 1988, 71, 196-203), а в качестве В-клеточной линии клеток CESS (ATCC TIB-190), трансформированных вирусом EB, положительных на EB вирус В-клеток SKW 6.4 (ATCC TIB-215), MC116 (ATCC CRL-1649), полученных при В-лимфоме, CCRF-SB (ATCC CCL-120), полученной из клеток при остром лимфобластном лейкозе, В-клеток RPMI 6410 (FCCH6047), полученных от пациента с острой миелоцитарной лейкемией, Daudi (ATCC CCL-213), полученной из клеток при лимфоме Буркитта, EB-3 (ATCC CCL-85), полученной из клеток при лимфоме Буркитта, Jiyoue (ATCC CCL-87), полученной из клеток при лимфоме Буркитта, Raji (ATCC CCL-86), полученной из клеток при лимфоме Буркитта и в качестве клеточной линии, не относящейся ни к Т-, ни к В-типам, HL-60 (ATCC CCL-240), полученной из клеток при острой миелоцитарной лейкемии, THP-1 (ATCC TIB-202), полученной из клеток при острой моноцитарной лейкемии, U-937 (ATCC CRL-1593), полученной из клеток при гистиоцитарной лимфоме, и К-562 (ATCC CCL-243), полученной из клеток при хронической миелоцитарной лейкемии, добавляют 100 мкл антитела против HM1.24 или очищенное контрольное мышиное антитело IgG2, разбавленное до концентрации 25 мкг/мл в FACS буфере (ФБР(-), содержащий 2% околородной сыворотки теленка и 0,1% азида натрия), после чего все инкубируют на льду в течение 30 минут.

После промывания в FACS буфере добавляют 100 мкл козьего противомышиного антитела (GAM), меченного ФИТЦ, в концентрации 25 мкг/мл и затем инкубируют смесь на льду в течение 30 минут. После промывания в FACS буфере клетки суспендируют в 600 мкл или 1 мл FACS буфера и в каждой клеточной суспензии измеряют интенсивность флуоресценции с помощью прибора FACScan (производство Becton Dickinson). Результаты, представленные на фиг. 1-23, подтверждают, что все Т-клеточные линии и все В-клеточные линии (за исключением Daudi и Raji, которые не реагируют), реагируют с антителом против HM1.24 и в высокой степени экспрессируют антиген HM1.24. С другой стороны, ни одна из клеточных линий, не относящихся к Т- или В-типу, не реагирует с антителом против HM1.24 и не экспрессирует антиген.

На гистограммах, приведенных на фиг. 1-23, маркеры показывают, что при окрашивании контрольным мышиным IgG2a негативные клетки составляют 98% и позитивные клетки составляют 2%. На основании картины, полученной с указанными гистограммными маркерами, был вычислен процент позитивных по антигену HM1.24 клеток при использовании антитела против HM1.24, и результат представлен в таблице. По проценту позитивных по антигену HM1.24 клеток уровень экспрессии антигена HM1.24 подразделили на 5 уровней: -, +/-, +, ++ и +++. В результате было подтверждено, что все Т-клеточные линии и В-клеточные линии (за исключением Daudi и Raji) в высокой степени экспрессируют антиген HM1.24, что аналогично результатам, показанным на фиг. 1-23. При этом во всех случаях использования клеточных линий, не относящихся к Т- и В-типам, процент позитивных по антигену HM1.24 клеток был отрицательным или составлял менее 5%, что указывает на то, что экспрессия антигена отсутствует или находится на очень низком уровне.

Пример 3. Определение КЗЦ активности  
КЗЦ активность антитела против HM1.24 по отношению к лимфатическим опухолевым клеткам определяется следующим образом:

### 1. Получение клеток-мишеней

В качестве клеток-мишеней готовят взвесь CCRF-CEM (ATCC CCL-119), полученную из клеток при остром лимфолейкозе, CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), полученную из клеток при остром лимфобластном лейкозе, HPB-MLT (FCCH1019), полученную из клеток при Т-лимфоме, EB-3 (ATCC CCL-85), полученную из клеток при лимфоме Буркитта, MC 116 (ATCC CRL-1649), полученную из клеток при лимфоме Буркитта, CCRF-SB (ATCC CCL-120), полученную из клеток при остром лимфолейкозе, и K562 (ATCC CCL-243), полученную из клеток при хронической миелоцитарной лейкемии, в концентрации  $4 \cdot 10^5$  клеток/мл в среде RPMI1640 (производство Gibco BRL), содержащей 10% околородной сыворотки теленка (Gibco BRL). Пятьдесят мкл каждой из этих клеточных суспензий вносят на 96-гнездную микротитрационную планшету с плоским дном (производство Falcon) и проводят инкубацию в инкубаторе с высокой влажностью в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (производство Tabai) в течение ночи при 37°C.

## 2. Получение антитела против HM1.24

Очищенное антитело против HM1.24, полученное в указанном выше Примере 1, готовят в концентрациях 0, 0,2, 2 и 20 мкг/мл в среде RPMI1640, содержащей 10% околплодной сыворотки теленка (производство Gibco BRL), и 50 мкл смеси добавляют к 96-гнезду микротитрационному планшету, подготовленному, как указано выше в Разделе 1. После инкубирования планшеты в инкубаторе с высокой влажностью в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (производство Tabai) при температуре 37°C в течение 60 минут, проводят центрифугирование на низкоскоростной центрифуге 05PR-22 (производство Hitachi) при 1000 об/мин в течение 5 минут и отбирают 50 мкл супернатанта.

## 3. Приготовление комплемента

Комплемент детенышей кролика (Baby Rabbit) (производство Cedarlane) растворяют в очищенной воде из расчета 1 мл на ампулу, и далее разбавляют в 5 мл среды RPMI1640 (производство Gibco-BRL), не содержащей околплодной сыворотки теленка. Пятьдесят мкл указанной смеси распределяют по 96-гнезду микротитрационному планшету с плоским дном, подготовленному, как указано выше, в Разделе 2, и проводят инкубацию в инкубаторе с высокой влажностью в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (производство Tabai) в течение 2-х часов при 37°C.

## 4. Определение КЗЦ активности

После завершения инкубации добавляют 10 мкл Alamar Blue (производство Bio Source) к каждой ячейке 96-гнездного микротитрационного планшета с плоским дном, описанного в Разделе 3, и проводят инкубацию в инкубаторе с высокой влажностью в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (производство Tabai) в течение 4-х часов при 37°C. Затем каждую ячейку промеряют на интенсивность флуоресценции (длина волны возбуждения 530 нм, длина волны эмиссии 590 нм) с использованием системы измерения флуоресценции CytoFluor 2350 (производство Millipore). Цитотоксическую активность (в процентах) вычисляют по формуле (A-C)/(B-C)•100, где А обозначает интенсивность флуоресценции при инкубировании в присутствии антитела, В обозначает интенсивность флуоресценции при инкубировании только в среде без добавления антитела, С обозначает интенсивность флуоресценции ячейки, не содержащей клеток.

Результаты показали, как видно из фиг. 24 и 25, что K562, которая не реагирует с антителом против HM1.24 по результатам анализа методом проточной цитометрии, не продемонстрировала цитотоксичности даже при добавлении антитела против HM1.24, тогда как CCRF-CEM, CCRF-HSB-2, HPB-MLT, EB-3, MC-116 и CCRF-SB, которые взаимодействуют с антителом против HM1.24, демонстрируют цитотоксичность способом, зависимым от концентрации антитела против HM1.24. Этот результат указывает, что антитело против HM1.24 проявляет КЗЦ активность в отношении лимфатической опухоли, несущей на клеточной поверхности белковый антиген, с которым антитело против HM1.24 специфически связывается.

Пример 4. Противоопухолевое действие антитела против HM1.24 в отношении мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека

## 1. Получение антитела для введения

## 1-1. Получение антитела против HM1.24

Очищенное антитело против HM1.24, полученное в приведенном выше примере 1, готовят в концентрации 1 мг/мл и 200 мкг/мл в стерильно отфильтрованном ФБР(-) и используют в следующих экспериментах.

## 1-2. Получение контрольного мышиного IgG2a

Очищенное антитело, полученное в указанном выше примере 2, готовят в концентрации 1 мг/мл в стерильно отфильтрованном ФБР(-) и используют в следующих экспериментах.

2. Противоопухолевый эффект антитела против HM1.24 на мышах с трансплантированной лимфатической опухолью человека

2-1. Получение мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека

Мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека получают следующим способом. Клетки CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), полученные при остром лимфобластном лейкозе и которые субкультивировали *in vivo* с использованием мышей SCID (Clea, Япония), готовят в виде взвеси в концентрации 1•10<sup>8</sup> клеток/мл в среде RPMI1640, содержащей 10% околплодной сыворотки теленка (производство Gibco-BRL). Клеточные суспензии, полученные как указано выше, инъецируют подкожно в брюшную полость мышей SCID (6-недельные самцы), на следующий день после введения им внутрибрюшинно 100 мкл антиаксиального препарата GM1 (Waco Pure Chemical Industries).

## 2-2. Введение антитела

На 7 день после трансплантации опухоли измеряют циркулем диаметр опухоли, образовавшейся в том месте, куда указанным мышам трансплантировали CCRF-HSB-2 с лимфатической опухолью человека. После определения объема опухоли животных группируют так, чтобы в каждой группе среднее значение объема опухоли было примерно одинаковым (по 8 животных на группу, всего 3 группы). Начиная с одного и того же дня, животным в каждой группе вводят внутрибрюшинно 100 мкл антитела против HM1.24 в концентрации 1 мг/мл или 200 мкг/мл, или 1 мкг/мл контрольного мышиного IgG2a, подготовленного как указано выше в Разделе 1. Введение проводят дважды в неделю, всего 19 раз аналогичным образом. В течение этого периода измеряют циркулем диаметр опухоли дважды в неделю и подсчитывают объем опухоли.

2-3. Оценка противоопухолевого эффекта антитела против HM1.24 на мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека

Противоопухолевый эффект антитела против HM1.24 оценивают по изменению объема опухоли и периода выживаемости мышей. В результате, как показано на фиг. 26, было установлено, что увеличение объема опухоли подавляется при введении животным антитела против HM1.24 в сравнении с

контрольной группой животных, которым вводили мышинный IgG2a. При этом, что также видно из Фиг. 27, при введении группе животных антитела против HM1.24 наблюдается увеличение периода выживаемости животных в сравнении с контрольной группой животных, которым вводят мышинный IgG2a. Эти факты указывают на то, что антитело против HM1.24 скрывают противоопухолевое действие на мышей с трансплантированной лимфатической опухолью человека.

Ссылочный пример 1. Получение гибридом, которые продуцируют мышинное моноклональное антитело против HM1.24

По методу Гото с соавт. (Goto, T. et al. , Blood, 1994, 84, 1922-1930) получают гибридомы, которые продуцируют мышинное моноклональное антитело против HM1.24.

Плазменную клеточную линию KPC-32 ( $1 \cdot 10^7$ ), полученную из костного мозга пациента с множественной миеломой человека (Goto, T. et al. , Jpn. J. Clin. Hematol. , 1991, 32, 1400) инъецируют дважды в брюшную полость мышей линии BALB/c (производство Charles River) каждые шесть недель.

За 3 дня до умерщвления животного в селезенку мыши инъецируют  $1,5 \cdot 10^6$  клеток KPC-32 для усиления антителообразующей способности мыши (Goto, T. et al. , Tokushima J. Exp. Med. , 1990, 37, 89). После умерщвления животного экстрагируют селезенку, и в экстрагированном органе проводят процедуру клеточного слияния с миеломной клеткой SP2/0 (по методу Groth, de St. and Schreidegger, Cancer Research, 1981, 41, 3465).

По методу ИФТФА на клетках (Posner, M. R. et al. , J. Immunol. Methods, 1982, 48, 23) с использованием KPC-32 проводят скрининг культурального супернатанта гибридом на наличие антитела.  $5 \cdot 10^4$  клеток KPC-32 суспендируют в 50 мл ФБР, аликвоту переносят на 96-гнездную микротитрационную планшету (U-образное гранулированное дно, производство Iwaki) и затем высушивают на воздухе при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение ночи. После блокирования реакции добавлением ФБР, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), вносят культуральный супернатант гибридом и проводят инкубацию при  $4^\circ\text{C}$  в течение 2-х часов. Затем проводят реакцию при  $4^\circ\text{C}$  в течение 1 часа козьего антитела против мышинного IgG, меченного пероксидазой (производство Zymed). После промывания проводят реакцию с раствором о-фениллекдиамин (производство Sumitomo Bakelite) при комнатной температуре в течение 30 минут.

Реакцию останавливают добавлением 2 н. серной кислоты и измеряют поглощение при 492 нм с использованием счетчика ИФТФД (производство Bio-Rad). Для отбора гибридом, которые продуцируют антитела против человеческого иммуноглобулина, культуральный супернатант позитивных гибридом вначале адсорбируют на человеческую сыворотку, после чего проводят скрининг реакционной способности в отношении других клеточных линий с помощью метода ИФТФА. Отбирают позитивные гибридомы и их реакционную

способность к различным клеткам определяют с помощью метода проточной цитометрии. Последний отобранный гибридомный клон клонируют дважды и инъецируют в брюшную полость мышей линии BALB/c, обработанных пристаном, и далее собирают из них асциты.

Из асцитов мыши получают моноклональные антитела и очищают их осаждением сульфатом аммония и с использованием набора для афинной хроматографии белка А (Ampure PA, производство Amersham). Очищенные антитела метят ФИТЦ с использованием набора Quick Tag FITC binding kit (производство Boehringer Mannheim).

В результате исследований показано, что моноклональные антитела, продуцируемые 30 гибридомными клонами, реагируют с KPC-3 и RPMI 8226. После клонирования исследуют реакционную способность клеточного супернатанта от указанных гибридом с другими клеточными линиями или моноядерными клетками периферической крови.

Из них 3 клон продуцируют моноклональные антитела, которые специфически реагируют с плазменной клеткой. Из указанных 3-х клонов был отобран и обозначен как HM1.24 гибридомный клон, который наиболее приемлем для анализа методом проточной цитометрии и который обладает КЗЦ активностью к RPMI 8226.

Подкласс моноклональных антител, продуцируемых указанными гибридомами, идентифицируют методом ИФТФА с использованием противомышиного антитела кролика, специфичного к данному подклассу (производство Zymed). Антитело против HM1.24 относится к подклассу IgG2a. Гибридома HM1.24, которая продуцирует антитело против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как FERM BP-5233 14 сентября 1995 года Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref. , Япония).

Ссылочный пример 2. Получение гуманизированного антитела против HM1.24

Гуманизированное антитело против HM1.24 получают в соответствии со следующим методом.

Из гибридомы HM1.24, полученной в ссылочном примере 1, получают общую РНК с использованием традиционного метода. На ее основе синтезируют кДНК, кодирующую V-область мышинного антитела, и амплифицируют по методу с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и по методу 5'-RACE. Получают фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий мышинную V-область, который лигируют с вектором клонирования на основе плазмиды pUC и затем вводят в компетентные клетки E. coli с получением трансформанта E. coli. Указанную плазмиду получают из трансформанта. Определяют традиционным методом нуклеотидную последовательность кодирующего участка кДНК в плазмиде и идентифицируют гипервариабельный участок (ГВУ) в каждой V-области.

Для конструирования вектора,



экспрессирующего химерное антитело против HM1.24, в HEF вектор вставляют кДНК, кодирующую V-область каждой из L-цепи и H-цепи мышинового антитела против HM1.24. Далее для конструирования гуманизованного антитела против HM1.24 ГБУ V-области мышинового антитела против HM1.24 пересаживают на человеческое антитело по методу пересадки ГБУ. L-цепь человеческого антитела REI используют в качестве L-цепи антитела человека, для каркасных областей (КО) 1-3 H-цепи человеческого антитела используют КО 1-3 человеческого антитела HG3 и КО4 из человеческого антитела JH6 используют для КО4. Некоторые аминокислоты в КО из V-области H-цепи замещают так, чтобы ГБУ-трансплантированное антитело могло сформировать подходящий сайт для связывания антигена.

Для экспрессии гена L-цепи и H-цепи сконструированного таким образом гуманизованного антитела против HM1.24 в клетки млекопитающего каждый ген отдельно вводят в вектор HEF для конструирования вектора, который будет экспрессировать L-цепь или H-цепь гуманизованного антитела против HM1.24 соответственно.

При одновременном введении указанных 2-х векторов экспрессии в CHO клетки устанавливается клеточная линия, которая продуцирует гуманизованное антитело против HM1.24. Антигенсвязывающая активность и ингибирование связывающей активности по отношению к клеточной линии WISH клеток амниона человека гуманизованного антитела против HM1.24, полученного при культивировании указанной клеточной линии,

были исследованы клеточным методом ИФТФА. Полученный результат показывает, что гуманизованное антитело против HM1.24 имеет антигенсвязывающую активность, равную таковой у химерного антитела, и в том, что касается активности по ингибированию связывания с использованием биотинсодержащего мышинового антитела против HM1.24, оно также проявляет активность, равную активности химерного антитела или мышинового антитела.

*E. coli*, несущая плазмиду, которая содержит ДНК, кодирующую V-область L-цепи, и ДНК, кодирующую V-область H-цепи химерного антитела против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L.-gk) и *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-gyl) 29 августа 1996 г. Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония) как FERM BP-5646 и FERM BP-5644 соответственно. Кроме того, *E. coli*, несущая плазмиду, которая содержит ДНК, кодирующую вариант а (SEQ ID NO: 2) V-области L-цепи или вариант г (SEQ ID NO: 3) V-области H-цепи гуманизованного антитела против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gk) и

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-gyl), соответственно, 29 августа 1996 г. Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония) как FERM BP-5645 и FERM BP-5643, соответственно. Далее, *E. coli*, несущая плазмиду, которая содержит ДНК, кодирующую вариант s (SEQ ID NO: 4) V-области H-цепи гуманизованного антитела против HM1.24, была депонирована в Международной Коллекции в соответствии с положениями Будапештского Договора как *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-gyl) 29 сентября 1997 г. Национальным Институтом биологических наук и гуманитарных технологий (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония) как FERM BP-6127.

Ссылочный пример 3. Клонирование кДНК, кодирующей белковый антиген HM1.24

Клонирование кДНК, кодирующую белковый антиген HM1.24, специфически распознаваемый антителом против HM1.24.

1. Конструирование библиотеки кДНК

1) Получение общей РНК

Из клеточной линии множественной миеломы человека KPM2 получают общую РНК по методу Чиргвина с соавт. (Chirgwin et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979). В соответствии с указанным методом, 2,2 $\cdot$ 10<sup>8</sup> клеток KPM2 полностью гомогенизируют в 20 мл 4 М гуанидинотиоцианата (производство Nacalai Tesque Inc.). Гомогенат наслаивают на 5,3 М раствор хлорида цезия в центрифужной пробирке, которую затем центрифугируют с использованием ротора Beckman SW40 со скоростью 31000 об/мин при 20°C в течение 24 часов для осаждения РНК. Осадок РНК промывают 70% этанолом и затем растворяют в 300 мкл 10 мМ Трис-НСI (рН 7,4), содержащем 1 М ЭДТА и 0,5% ДСН. Добавляют проназу (производство Boehringer) до концентрации 0,5 мг/мл и затем проводят инкубацию при температуре 37°C в течение 30 минут. Смесь экстрагируют фенолом и хлороформом и РНК осаждают этанолом. Осадок РНК растворяют в 200 мкл 10 мМ Трис-НСI (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА.

2) Получение поли(А)+РНК

Поли(А)+РНК очищают с использованием в качестве исходного материала 500 мкг общей РНК, полученной по описанному выше методу с помощью набора для выделения мРНК Fast Track 2,0 mRNA Isolation Kit (производство Invitrogen) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией.

3. Конструирование библиотеки ДНК

Синтезируют двуцепочечную кДНК с использованием в качестве исходного материала 10 мкг указанной выше поли-(А)+РНК с помощью набора для синтеза кДНК TimeSaver cDNA Synthesis Kit (производство Pharmacia), в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией, и затем проводят лигирование с EcoRI адаптером, поставляемым в наборе, с использованием Directional Cloning Toolbox (производство

Pharmacia), в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Кэширование и обработку рестрикционным ферментом NotI адаптера EcoRI проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору. Далее двуцепочечную кДНК, прилагаемую к адаптеру, имеющую размер 500 нп или более, отделяют и очищают с использованием 1,5% низкоплавкого агарозного геля (производство Sigma) с получением 40 мкл добавленной к адаптеру цепочечной кДНК.

Полученную таким образом добавленную к адаптеру двуцепочечную кДНК лигируют с использованием вектора pCOS1 (заявка на патент Японии 8-255196) и ДНК-лигазы T4 (производство Gibco-BRL), которая была предварительно обработана рестриктазами EcoRI и NotI и щелочной фосфатазой (производство Takara Shuzo) для создания библиотеки кДНК. Сконструированную библиотеку кДНК с помощью трансдукции вводят в штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  (производство Gibco-BRL), при этом впоследствии было установлено, что это независимый клон, имеющий общий размер около  $2,5 \cdot 10^6$ .

2. Клонирование методом прямой экспрессии

1) Трансфекция COS-7 клеток

Примерно  $5 \cdot 10^5$  клонов указанного выше штамма трансдуцированной *E. coli* культивируют в среде 2-YT (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, для амплификации кДНК, которую подвергают обработке по щелочному методу (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), с восстановлением плазмидной ДНК из *E. coli*. Полученную таким образом плазмидную ДНК переносят методом трансфекции в COS-7 клетки методом электропорации с использованием прибора Gene Pulser (производство Bio-Rad).

В соответствии с указанным методом, 10 мкг очищенной плазмидной ДНК добавляют к 0,8 мл раствора COS-7 клеток, в котором клетки были суспендированы в ФБР в концентрации  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл, и полученную смесь подвергают воздействию импульсов в 1500 В при емкости 25 мкФ. По окончании 10-минутного восстановительного периода при комнатной температуре клетки после электропорации культивируют в культуральной среде DMEM (производство Gibco-BRL), содержащей 10% околородной сыворотки теленка (производство Gibco-BRL) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO $_2$  в течение 3-х дней.

2) Подготовка кюветы

Кювету, на которую наносят мышиное антитело против HM1.24, готовят по методу Сиды с соавт. (B. Seed et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369, 1987). В соответствии с указанным методом мышиное антитело против HM1.24 добавляют к 50 мМ Трис-HCl (pH 9,5) до концентрации 10 мкг/мл. Три миллилитра приготовленного таким образом раствора антитела добавляют к чашке с клеточной культурой диаметром 60 мм и инкубируют при комнатной температуре в течение 2-х часов. После промывания 3 раза 0,15 М раствором NaCl к чашке добавляют ФБР, содержащий 5% околородной сыворотки теленка, 1 мМ ЭДТА и 0,02%

NaN $_3$ . Смесь после блокирования используют для последующего клонирования.

3) Клонирование библиотеки кДНК

COS-7 клетки, подвергшиеся трансфекции по описанному выше методу, обрабатывают ФБР, содержащим 5 мМ ЭДТА. После однократного промывания клеток ФБР, содержащим 5% околородной сыворотки теленка, их суспендируют в ФБР, содержащем 5% околородной сыворотки теленка и 0,02% NaN $_3$  до концентрации примерно  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл. Суспензию вносят в кювету, подготовленную как указано выше, и проводят инкубацию при комнатной температуре в течение примерно 2-х часов. После осторожного трехкратного промывания ФБР, содержащим 5% околородной сыворотки теленка и 0,02% NaN $_3$ , выделяют плазмидную ДНК из клеток, связанных с кюветой, с использованием раствора, содержащего 0,6% DCH и 10 мМ ЭДТА.

Восстановленную плазмидную ДНК переносят методом трансдукции в *E. coli* DH5 $\alpha$ . После амплификации по описанному выше методу плазмидную ДНК восстанавливают щелочным методом. Восстановленную плазмидную ДНК переносят путем трансфекции в COS-7 клетки с помощью электропорации и восстановленную из клеток плазмидную ДНК связывают, как описано выше. Повторяют один раз аналогичную процедуру и восстановленную плазмидную ДНК расщепляют рестриктазами. EcoRI и NotI, что подтверждает факт наличия вставки, имеющей размер около 0,9 тыс. нм. Клетки *E. coli*, в которых часть восстановленной плазмидной ДНК была перенесена путем трансдукции, инокулируют на чашку с 2-YT агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина. После культивирования в течение ночи выделяют из одной колонии плазмидную ДНК. Ее расщепляют рестриктазами EcoRI и NotI с получением клона p3.19, в котором размер вставки составляет примерно 0,9 тыс. нп.

Проводят реакцию указанного клона с использованием набора для секвенирования PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencing kit (производство Perkin Elmer), в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией и определяют нуклеотидную последовательность с использованием секвенатора ДНК ABI 373A DNA Sequencer (производство Perkin Elmer). Указанная нуклеотидная последовательность и соответствующая аминокислотная последовательность представлены в SEQ ID NO: 1.

Промышленная применимость

Результаты анализа методом проточной цитометрии показали, что антитело против HM1.24 активно взаимодействует с большинством клеток, полученных из опухолей лимфатических тканей, указывая на то, что в случае, многих опухолей лимфатических тканей полипептид, имеющий эпитоп, распознаваемый антителом против HM1.24, экспрессируется в высокой степени. Кроме того, введение мышам с трансплантированной лимфатической опухолью человека, которая реагирует с антителом HM1.24, антитела против HM1.24 приводит к подавлению роста объема опухоли, а также к увеличению периода выживания. Указанные факты показывают, что

антитело против HM1.24 или антитела, распознаваемые, полипептидом, имеющим эпитоп, распознаваемый антителом против HM1.24, обладают цитотоксической активностью против многих опухолей лимфатических тканей и это дает основание предполагать, что указанное антитело может использоваться для лечения больных с опухолями лимфатических тканей.

Ссылка на микроорганизмы, депонированные в соответствии с договором по Патентному сотрудничеству (Patent Cooperation Treaty), Положение 13-2 и наименование Депонирующего Института.

Депонирующий Институт

Наименование: Национальный Институт биологических наук и гуманитарных технологий. Агентство промышленной науки и технологии (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency-of Industrial Science and Technology)

Адрес: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Япония

Микроорганизм (1)

Наименование: Escherichia coli  
DH5  $\alpha$  (pRS38-pUC19)

Номер хранения: FERM BP-4434

Дата депонирования: 5 октября 1993 года

Микроорганизм (2)

Наименование: Гибридома HM1.24

Номер хранения: FERM BP-5233

Дата депонирования: 14 сентября 1995 г.

Микроорганизм (3)

Наименование: Escherichia coil  
DH5  $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-gyl)

Номер хранения: FERM BP-5643

Дата депонирования: 29 августа 1996 г.

Микроорганизм (4)

Наименование: Escherichia coil  
DH5  $\alpha$  (pUC19-I. 24H-gyl)

Номер хранения: FERM BP-5644

Дата депонирования: 29 августа 1996 г.

Микроорганизм (5)

Наименование: Escherichia coli  
DH5  $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gk)

Номер хранения: FERM BP-5645

Дата депонирования: 29 августа 1996 г.

Микроорганизм (6)

Наименование: Escherichia coli  
DH5  $\alpha$  (pUC19-I. 24L-gk)

Номер хранения: FERM BP-5646

Дата депонирования: 29 августа 1996 г.

Микроорганизм (7)

Наименование: Escherichia coli  
DH5  $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-gyl)

Номер хранения: FERM BP-6127

Дата депонирования: 29 сентября 1997 г.

### Формула изобретения:

1. Лекарственное средство, применяемое при лечении опухолей лимфатической ткани (за исключением миеломы), включающее в качестве активного ингредиента антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO : 1, и которое обладает цитотоксической активностью.

2. Лекарственное средство по п. 1, отличающееся тем, что указанная опухоль лимфатической ткани представляет собой опухоль Т-клеток.

3. Лекарственное средство по п. 1, отличающееся тем, что указанная опухоль лимфатической ткани представляет собой

опухоль В-клеток (за исключением миеломы).

4. Лекарственное средство по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

5. Лекарственное средство по п. 1, отличающееся тем, что указанная цитотоксическая активность представляет собой антителообусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC/AOKЦ активность).

6. Лекарственное средство по п. 1, отличающееся тем, что указанная цитотоксическая активность представляет собой комплементзависимую цитотоксичность (CDC/K3Ц активность)

7. Лекарственное средство по п. 4, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область C $\gamma$  из человеческого антитела.

8. Лекарственное средство по п. 7, отличающееся тем, что указанная константная область C $\gamma$  из человеческого антитела представляет собой C $\gamma$ 1 или C $\gamma$ 3.

9. Лекарственное средство по п. 7, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело против HM1.24, который продуцируется гибридомой FERM BP-5233.

10. Лекарственное средство по п. 4, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

11. Лекарственное средство по п. 9, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой химерное антитело против HM1.24.

12. Лекарственное средство по п. 9, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело против HM1.24.

13. Лекарственное средство по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом, распознаваемым антителом против HM1.24.

14. Антитело, которое специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO : 1, и которое обладает цитотоксической активностью.

15. Антитело по п. 14, отличающееся тем, что указанная цитотоксическая активность представляет собой антителообусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC/AOKЦ активность).

16. Антитело по п. 14, отличающееся тем, что указанная цитотоксическая активность представляет собой комплементзависимую цитотоксичность (CDC/K3Ц активность).

17. Лекарственное средство по п. 4, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческое антитело.

18. Лекарственное средство по п. 2, отличающееся тем, что указанная опухоль Т-клеток выбирается из группы, состоящей из острого Т-лимфолейкоза (Т-ОЛЛ), хронического Т-лимфолейкоза (Т-ХЛЛ), заболевания, связанного с человеческим вирусом Т-клеток (АТЛ), лимфому периферических Т-клеток не АТЛ-типа (ПНТЛ).

19. Лекарственное средство по п. 3, отличающееся тем, что указанная опухоль В-клеток выбирается из группы, состоящей из острого В-лимфолейкоза (В-ОЛЛ), хронического В-лимфолейкоза (В-ХЛЛ),

пре-В-лимфому, лимфому Буркитта,  
фолликулярную лимфому, фолликулярную

лимфому коры головного мозга, диффузную  
лимфому.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-20-

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

	Название клеток	Уровень экспрессии	
В-клеточная линия	CESS	+++	94.5
	SKW 6,4	+++	92.9
	MC116	++	65.0
	CCRF-SB	+++	98.4
	RPMI6410	+++	94.5
	EB-3	+++	88.3
	Jijoye	+++	92.3
	Daudi	-	2.8
	Raji	-	2.0
Т-клеточная линия	RPMI 8402	+++	94.0
	CCRF-CEM	+++	97.9
	HPB-ALL	++	63.8
	HPB-MLT	+++	94.6
	JM	+++	99.6
	MOLT-4	+++	84.1
	Jurkat	++	70.9
	CCRF-HSB-2	+++	100.0
	MT-1	+++	95.9
	KT-3	+++	96.0
Клеточная линия, не относящаяся к В- и Т-типам	HL-60	~	2.9
	THP-1	-	1.5
	U-937	-	1.1
	K-562	-	3.9

-, <5%; +/-, 5-20%; +, 20-50%; ++, 50-80%; +++, >80%

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1

Длина последовательности: 1013

Тип последовательности: нуклеиновая кислота

Число цепей: одноцепочечная

Топология: линейная

Молекулярный тип: кДНК

GAATTTCGGCA CGAGGGATCT GG ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys	
1 5	
AGA GTG CCC ATG GAA GAC GGG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GGG	97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly	
10 15 20 25	
ATA GGA ATT CTG GTG CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG	145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
ATT ATC TTC ACC ATC AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CGG GAC GGC CTT	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
CGG GCA GTG ATG GAG TGT CGC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
CTG ACC GAG GCC CAG AAG GGC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC GCC	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	
ACC TGC AAC CAC ACT GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG	337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu	
90 95 105	
AAG GCC CAA GGA CAA AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT	385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr	
110 115 120	
ACA TTA AAC CAT AAG CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG	433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu	
125 130 135	
AGA AGA GAA AAC CAG GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC	481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr	
140 145 150	
TAC CCC AGC TCC CAG GAC TCC AGC TCC GCT GCG GCG CCC CAG CTG CTG	529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu	
155 160 165	
ATT GTG CTG CTG GGC CTC AGC GCT CTG CTG CAG TGA GATCCCAGGA	575
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln ***	
170 175 180	
AGCTGGCACA TCTTGGAAGG TCCGTCCTGC TCGGCTTTTC GCTTGAACAT TCCCTTGATC	635
TCATCAGTTC TGAGCGGGTC ATGGGGCAAC ACGGTTAGCG GGGAGAGCAC GGGGTAGCCG	695
GAGAAGGGCC TCTGGAGCAG GTCTGGAGGG GCCATGGGGC AGTCCTGGGT GTGGGGACAC	755
AGTCGGGTTG ACCCAGGGCT GTCTCCCTCC AGAGCCTCCC TCCGGACAAT GAGTCCCCCC	815
TCTTGCTCTCC CACCCTGAGA TTGGGCATGG GGTGCGGTGT GGGGGGCATG TGCTGCCTGT	875
TGTTATGGGT TTTTTTTGCG GGGGGGGTTG CTTTTTCTG GGGTCTTTGA GCTCCAAAAA	935
AATAAACACT TCCTTTGAGG GAGAGCACAC CTTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	995
AAAAATTCGGG CGGCCGCC	1013

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

SEQ ID NO: 2

Длина последовательности: 379

Тип последовательности: нуклеиновая кислота

Топология: линейная

Молекулярный тип: кДНК

Последовательность

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
-1 1 5 10	
AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCT AGT CAG GAT GTG	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val	
15 20 25	
AAT ACT GCT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
30 35 40 45	
CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAG CAA CAT TAT AGT	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	
ACT CCA TTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

SEQ ID NO: 3

Длина последовательности: 418

Тип последовательности: нуклеиновая кислота

Топология: линейная

Молекулярный тип: кДНК

Последовательность

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

GAG	TGG	ATG	GGA	TCT	ATT	TTT	CCT	GGA	GAT	GGT	GAT	ACT	AGG	TAC	AGT	240
Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	
				50					55					60		
CAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AGA	GTC	ACC	ATG	ACC	GCA	GAC	AAG	TCC	ACG	AGC	288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
			65					70					75			
ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCC	GTG	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
		80					85					90				
TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GGA	TTA	CGA	CGA	GGG	GGG	TAC	TAC	TTT	GAC	TAC	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	
		95				100					105					
TGG	GGG	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	G					418
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
110					115					120						

SEQ ID NO: 4

Длина последовательности: 418

Тип последовательности: нуклеиновая кислота

Топология: линейная

Молекулярный тип: кДНК

Последовательность

ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	AGG	GTC	TTC	TTC	TTG	CTG	GCT	GTA	GCT	CCA	GGT	48
Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Val	Phe	Phe	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	
				-15					-10					-5		
GCT	CAC	TCC	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	96
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
		-1	1				5					10				
CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCA	TCT	GGA	TAC	ACC	TTC	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
		15				20					25					
ACT	CCC	TAC	TGG	ATG	CAG	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA	CAA	GGG	CTT	192
Thr	Pro	Tyr	Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
		30			35				40						45	
GAG	TGG	ATG	GGA	TCT	ATT	TTT	CCT	GGA	GAT	GGT	GAT	ACT	AGG	TAC	AGT	240
Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	
				50					55					60		
CAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACC	GCA	GAC	AAG	TCC	ACG	AGC	288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
			65					70					75			
ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCC	GTG	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
		80					85					90				
TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GGA	TTA	CGA	CGA	GGG	GGG	TAC	TAC	TTT	GAC	TAC	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	
		95				100					105					
TGG	GGG	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	G					418
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
110					115					120						

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2



ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA  
 <120> Лекарственное средство, применяемое при лечении  
 опухолей лимфатических тканей  
 <130> E908  
 <140> PCT/JP98/00568  
 <141> 1998-02-12  
 <150> JP 9-41410  
 <151> 1997-02-12  
 <160> 8  
 <210> 1  
 <211> 1013  
 <212> ДНК  
 <213> Homosapiens  
 <223> Нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующей антиген  
 HM1.24  
 <400> 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tgg tat gac tat tgc	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys	
1 5	
aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg	97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly	
10 15 20 25	
ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg	145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

```

acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg got tcc ctg gat gca gag 337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
90 95 100 105
aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
110 115 120
aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
125 130 135
aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
140 145 150
tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu
155 160 165
att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga 575
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln
170 175 180
agctggcaca tcttgggaagg tccgtcctgc tccgcttttc gcttgaacat tcccttgatc 635
tcatcagttc tgagogggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695
gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtccctgggt gtggggacac 755
agtggggttg acccagggct gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gactcccccc 815
tcttgtotcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcgggtg ggggggcatg tgctgcctgt 875
tgttatgggt tttttttgcg gggggggtg cttttttctg gggctcttga gctccaaaaa 935
aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
aaaattcggg cggccgcc 1013

```

<210> 2

<211> 379

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221>

<222>

<223> Нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующей V-  
область L-цепи варианта а гуманизированного антитела против HM1.24

<400> 2

```

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc tcc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-15 -10 -5
gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc 96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
-1 1 5 10
agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gct agt cag gat gtg 144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
15 20 25
aat act get gta gcc tgg tac cag cag aag cca gga aag gct cca aag 192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
30 35 40 45

```

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

ctg ctg atc tac tcg gca tcc aac cgg tac act ggt gtg cca agc aga	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
ctc cag cca gag gac atc gct acc tac tac tgc cag caa cat tat agt	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	
act cca ttc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa c	379
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

<210> 3

<211> 418

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221>

<222>

<223> Нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующей V-  
область H-цепи варианта r гуманизированного антитела против HM1.24

<400> 3

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg oga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atg acc gca gac aag tcc acg agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gga tta oga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

<210> 4

<211> 418

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221>

<222>

<223> Нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующей V-область Н-цепи варианта s антитела против HM1.24

<400> 4

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
cag aag ttc aag gcc aga gtc acc atc acc gca gac aag tcc acg agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

<210> 5

<211> 180

<212> белок

<213> Homosapiens

<223> Аминокислотная последовательность антигена HM1.24

<400> 5

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

```

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys
1           5
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly
10          15          20
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu
30          35          40
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu
45          50          55
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu
60          65          70
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala
75          80          85
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
90          95          105
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
110         115         120
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
125         130         135
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
140         145         150
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu
155         160         165
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln
170         175         180

```

<210> 6

<211> 126

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221>

22>

<223> Аминокислотная последовательность V-области L-цепи

варианта а гуманизированного антитела против HM1.24

<400> 6

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-15          -10          -5
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
-1  1          5          10
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
15          20          25
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
30          35          40
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
50          55          60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
65          70          75
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
80          85          90
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95          100         105

```

<210> 7

<211> 139

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221>

<222>

<223> Аминокислотная последовательность V-области Н-цепи

варианта r гуманизированного антитела против HM1.24

<400> 7

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Val	Phe	Phe	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly
				-15					-10					-5	
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
		-1	1				5					10			
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
	15					20					25				
Thr	Pro	Tyr	Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	30				35					40					45
Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
				50					55						60
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
			65					70					75		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
		80					85					90			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
	95					100					105				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
110					115					120					

<210> 8

<211> 139

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221>

<222>

<223> Аминокислотная последовательность V-области Н-цепи ва-

рианта s гуманизированного антитела против HM1.24

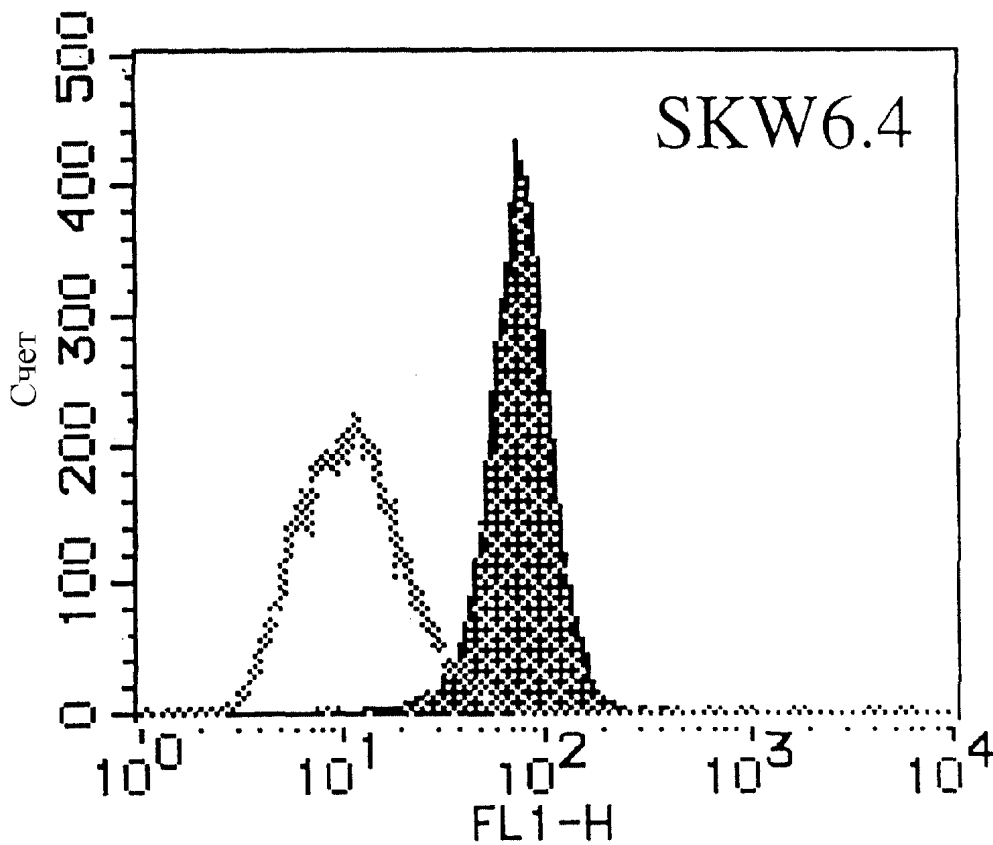
<400> 8

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Val	Phe	Phe	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly
				-15					-10					-5	
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
		-1	1				5					10			
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
	15					20						25			
Thr	Pro	Tyr	Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
30					35					40					45
Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
				50					55					60	
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
			65				70						75		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
		80					85					90			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
	95					100					105				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
110					115					120					

## B-2

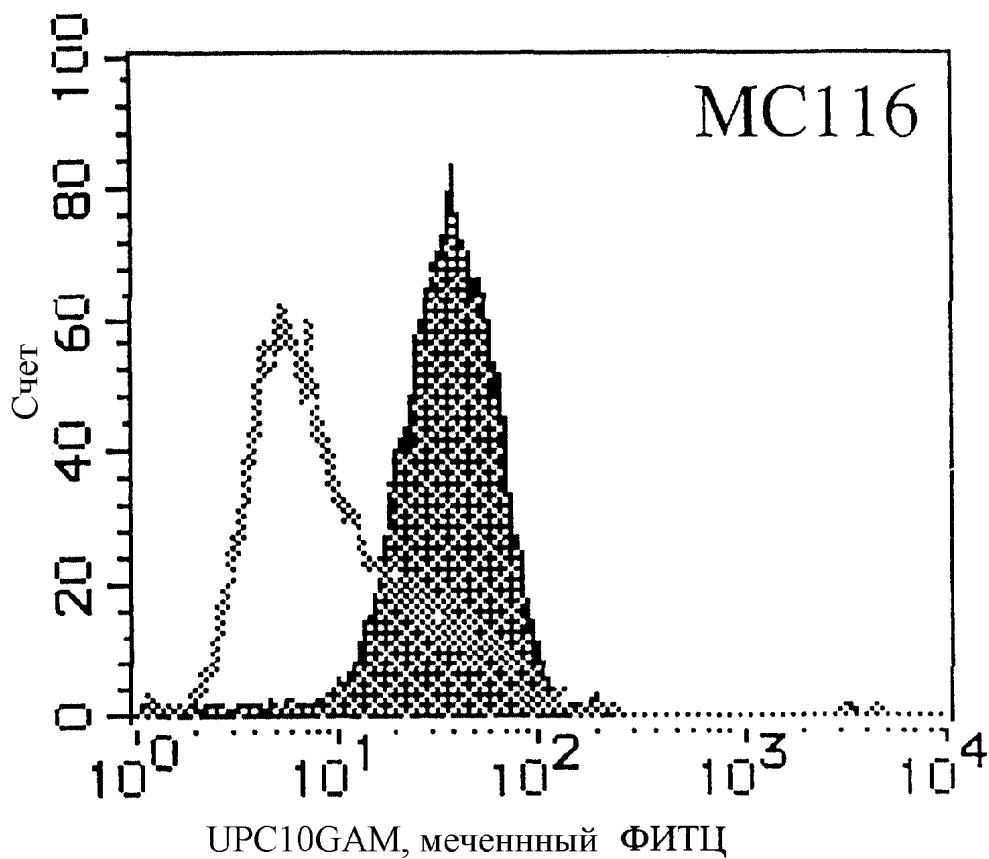


Фиг.2

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

B-3



Фиг.3

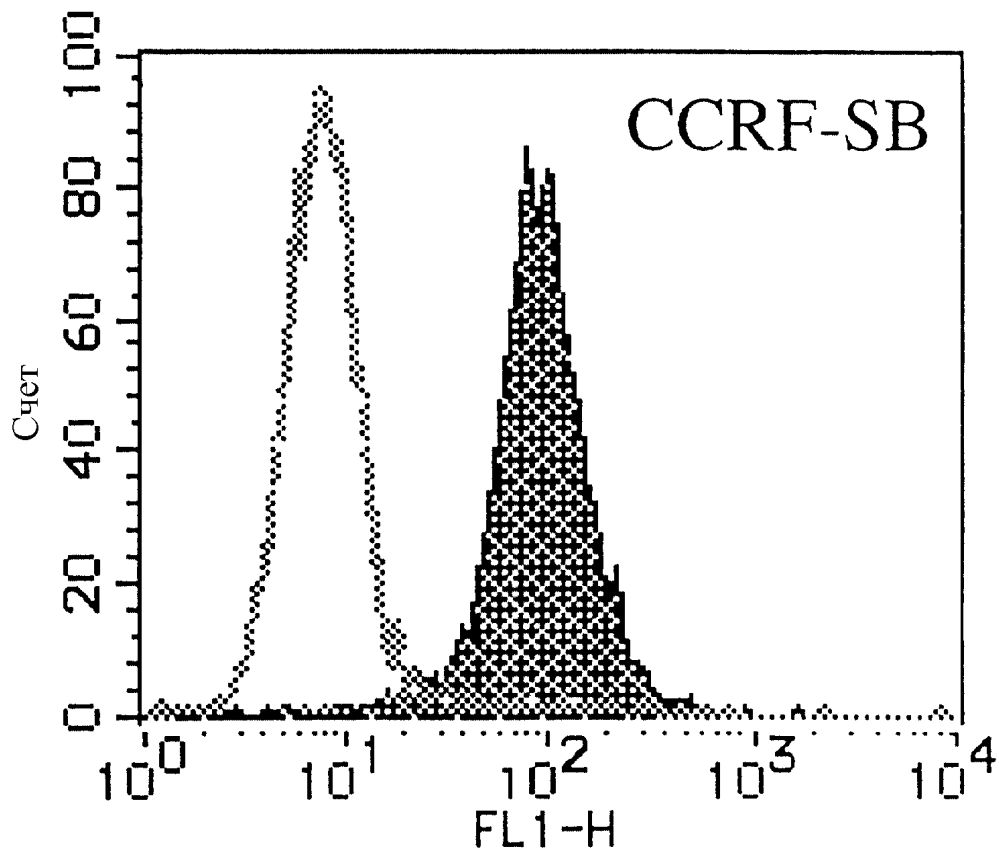
RU 2177805 C2

RU 2177805 C2



RU 2177805 C2

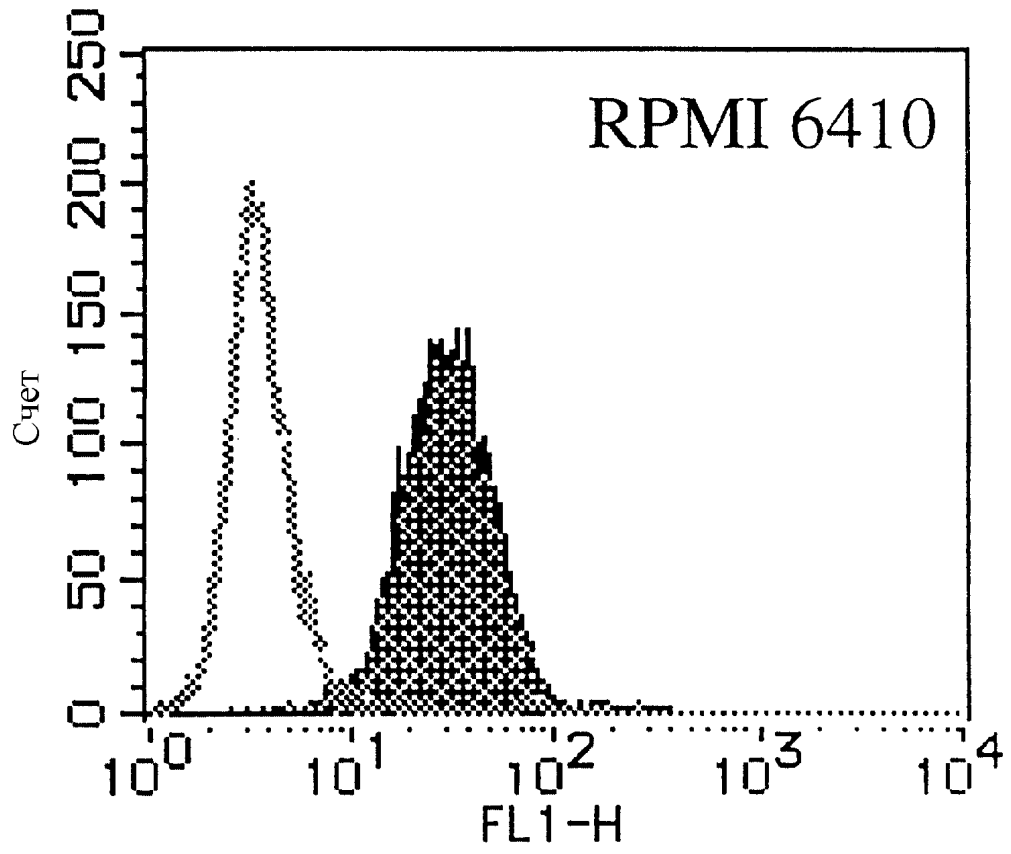
B-4



Фиг.4

RU 2177805 C2

B-5

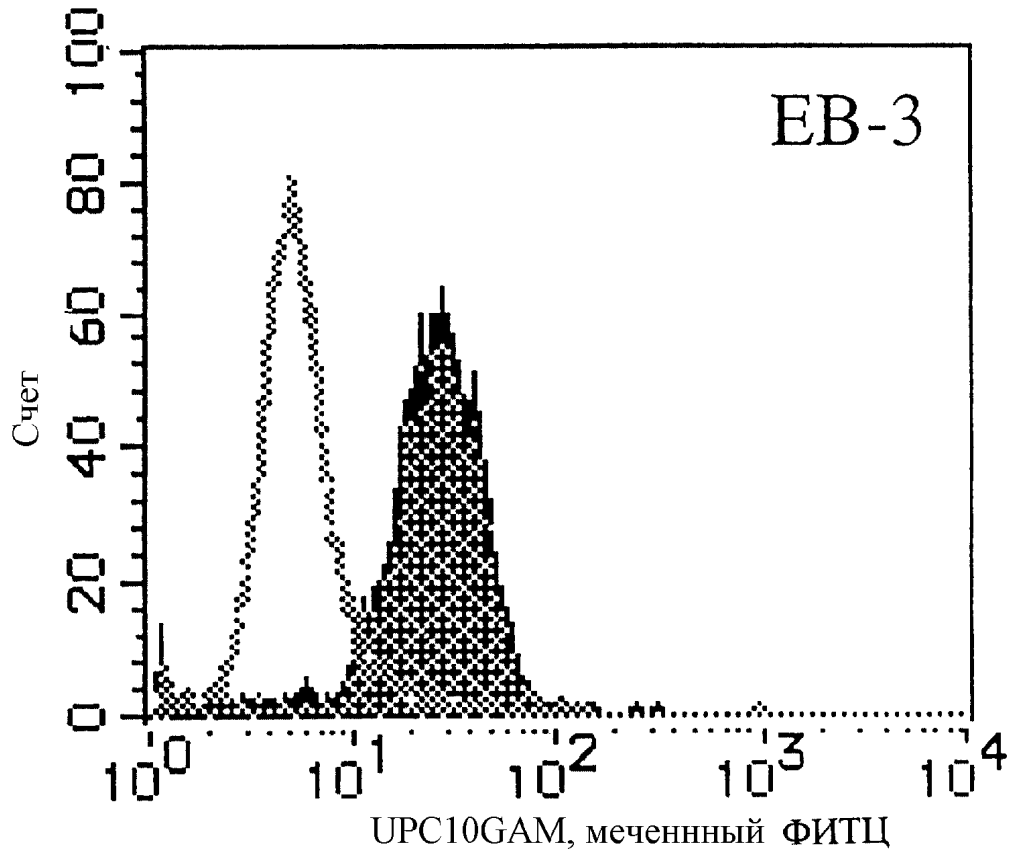


Фиг.5

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

**B-6**

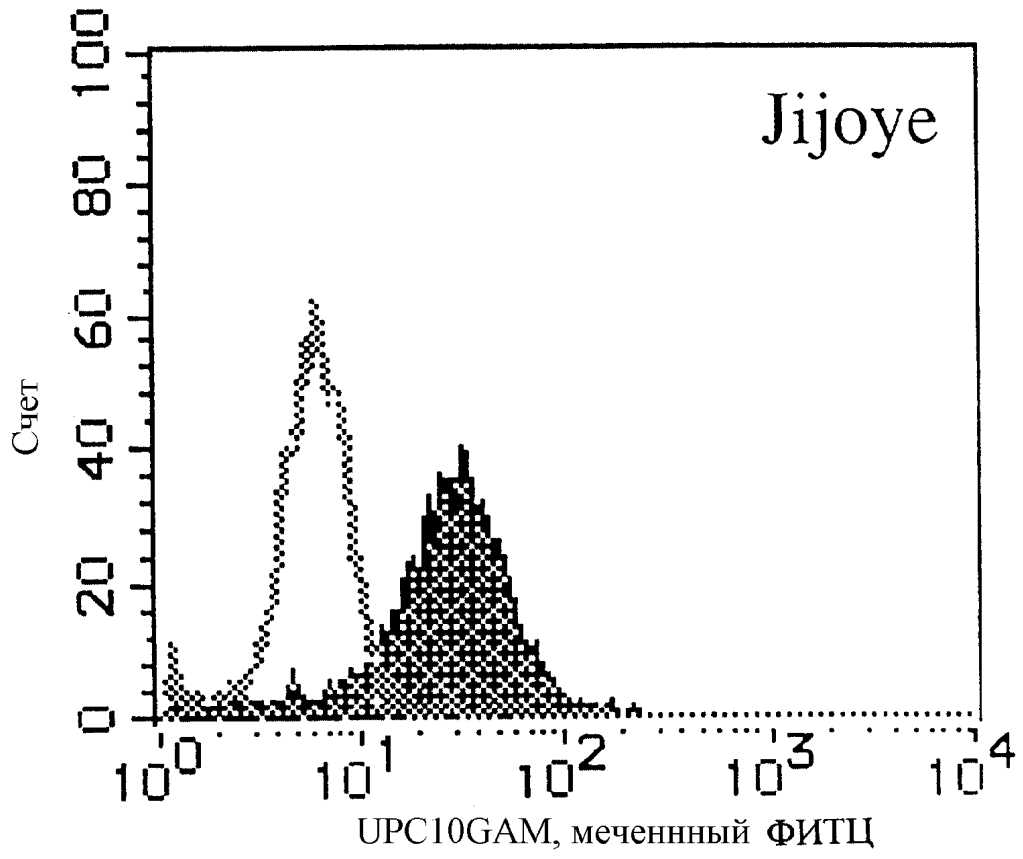


Фиг.6

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

B-7

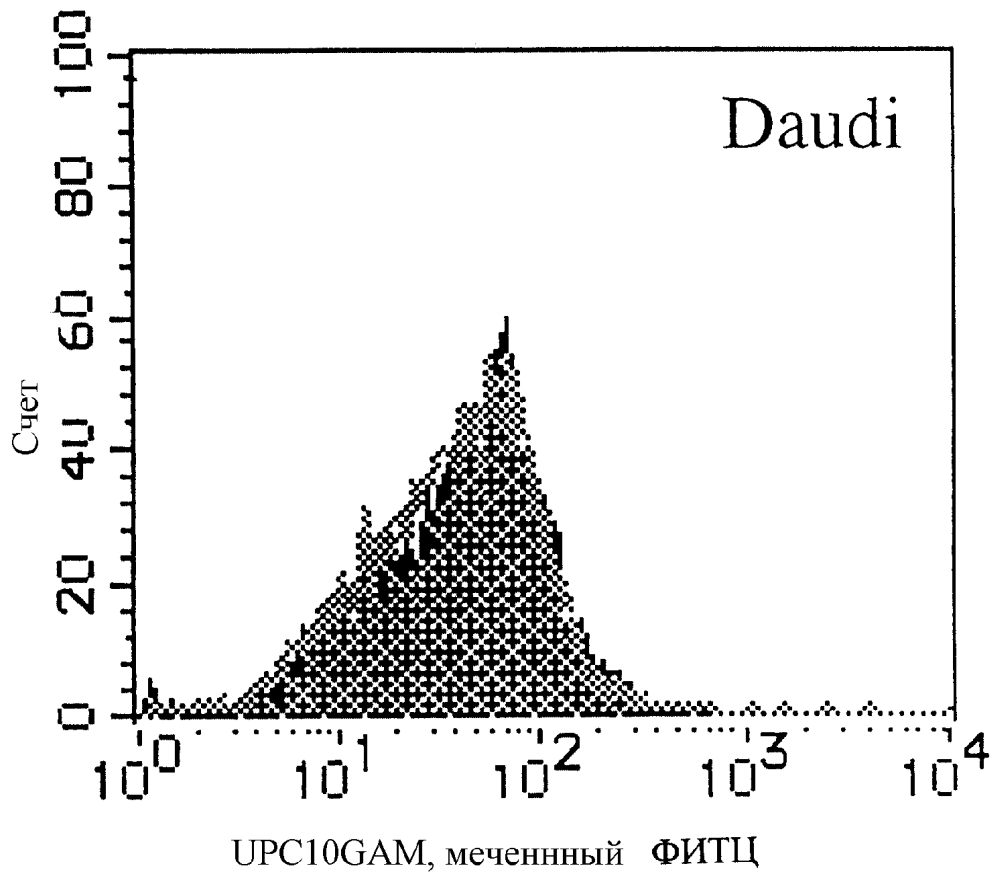


Фиг.7

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

# B-8



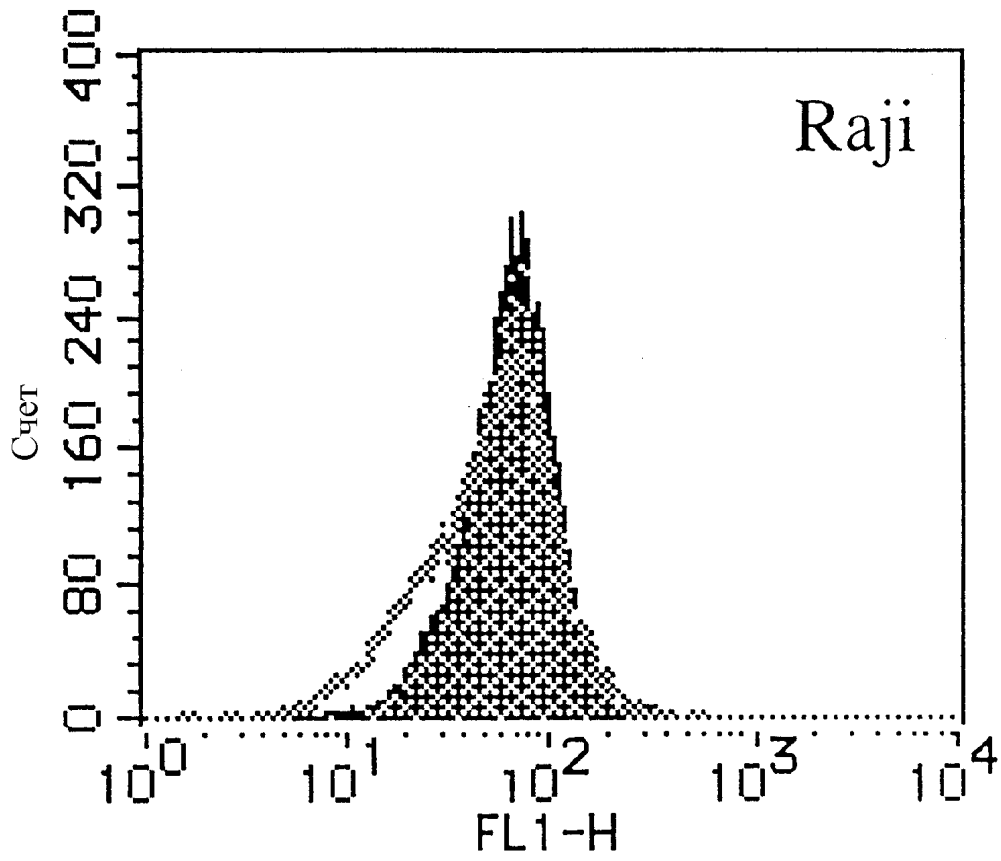
Фиг.8

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

# B-9

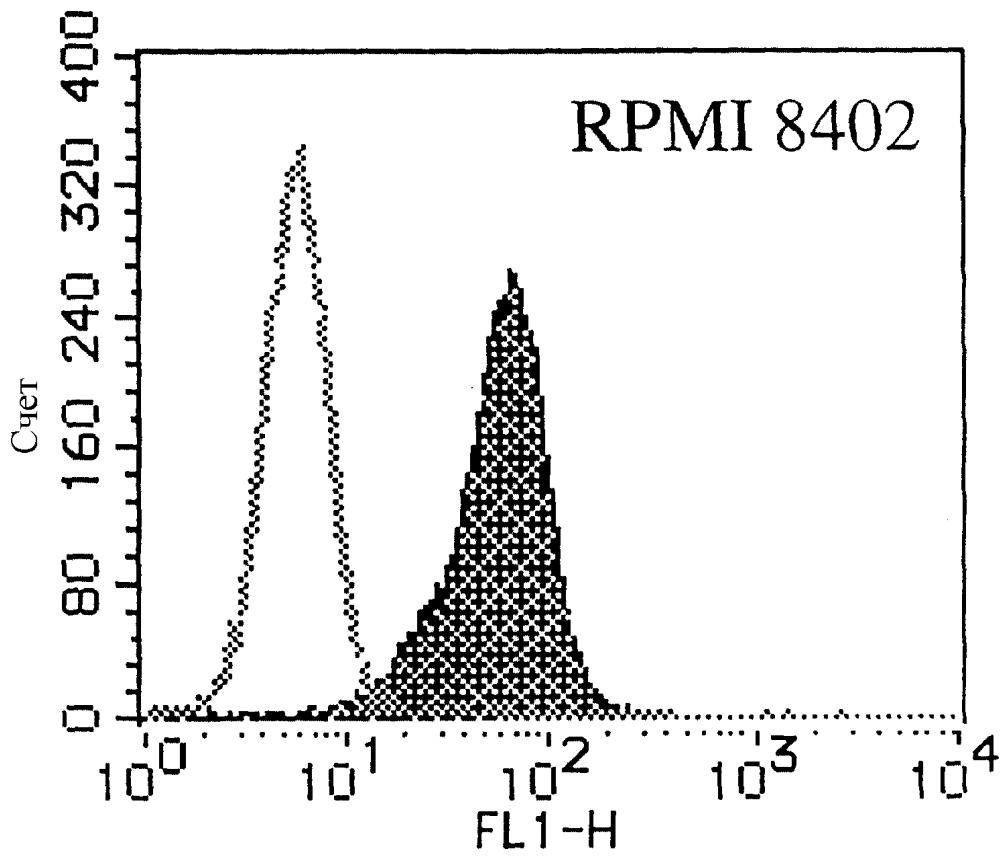


Фиг.9

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

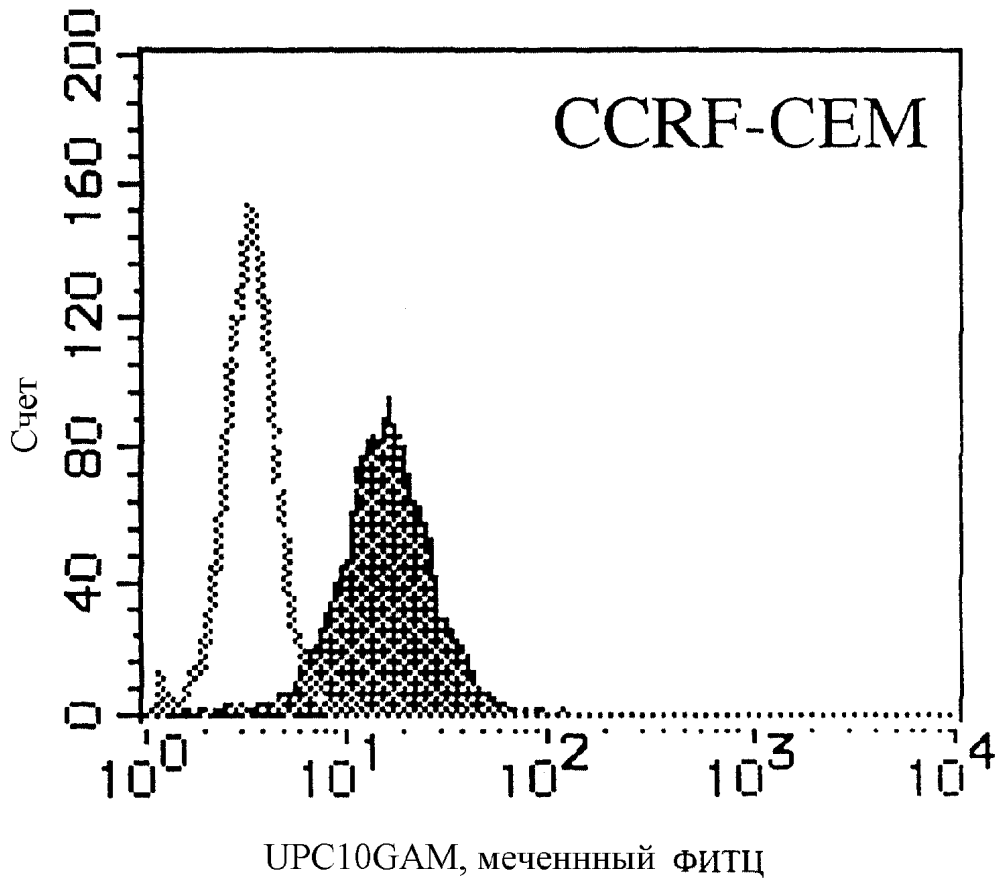
T-1



Фиг.10

RU 2177805 C2

T-2



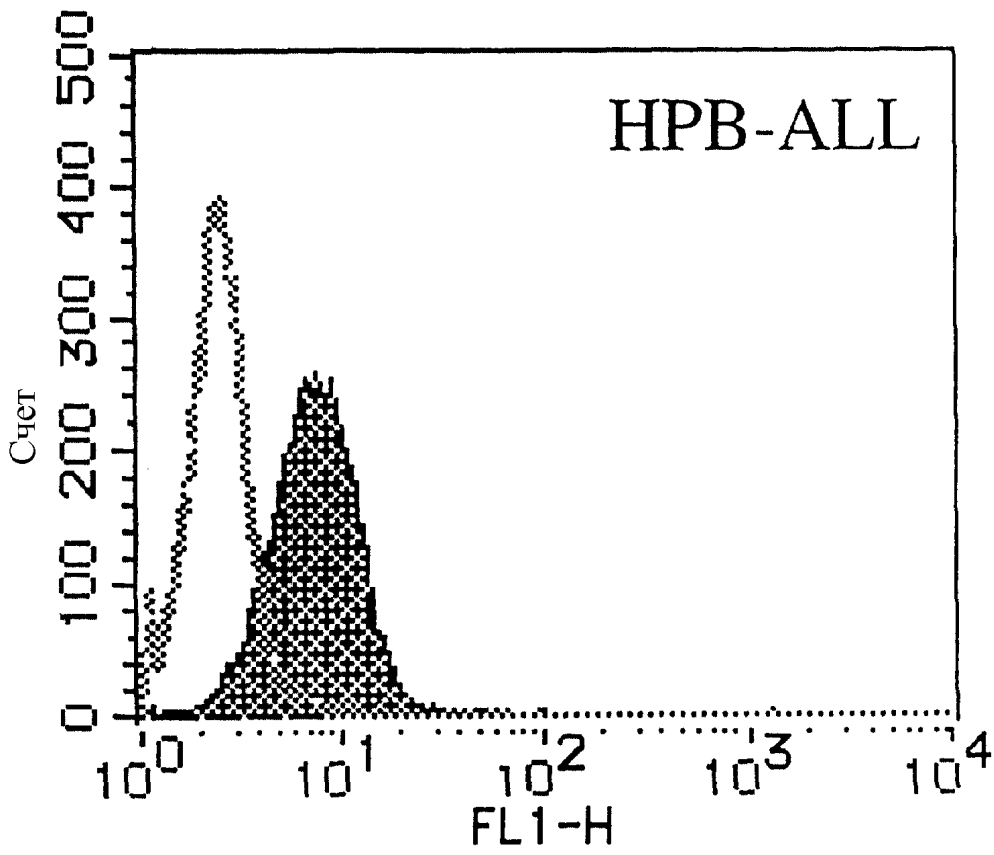
Фиг.11

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2



T-3

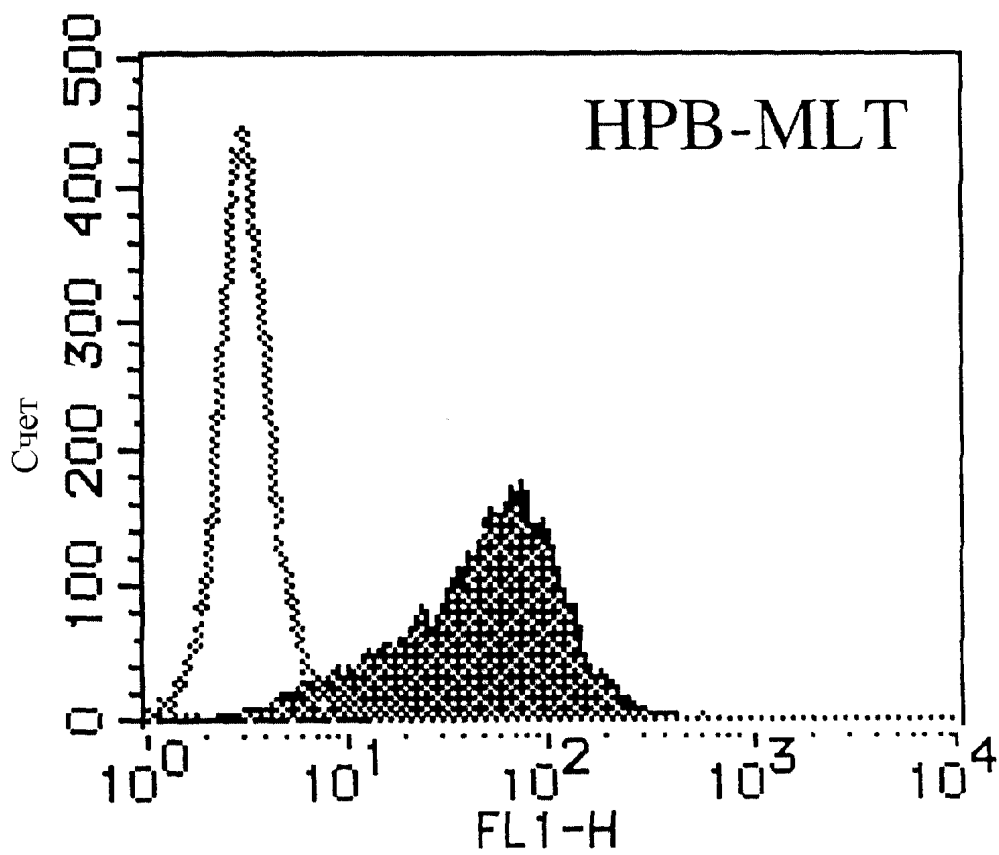


Фиг.12

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

T-4

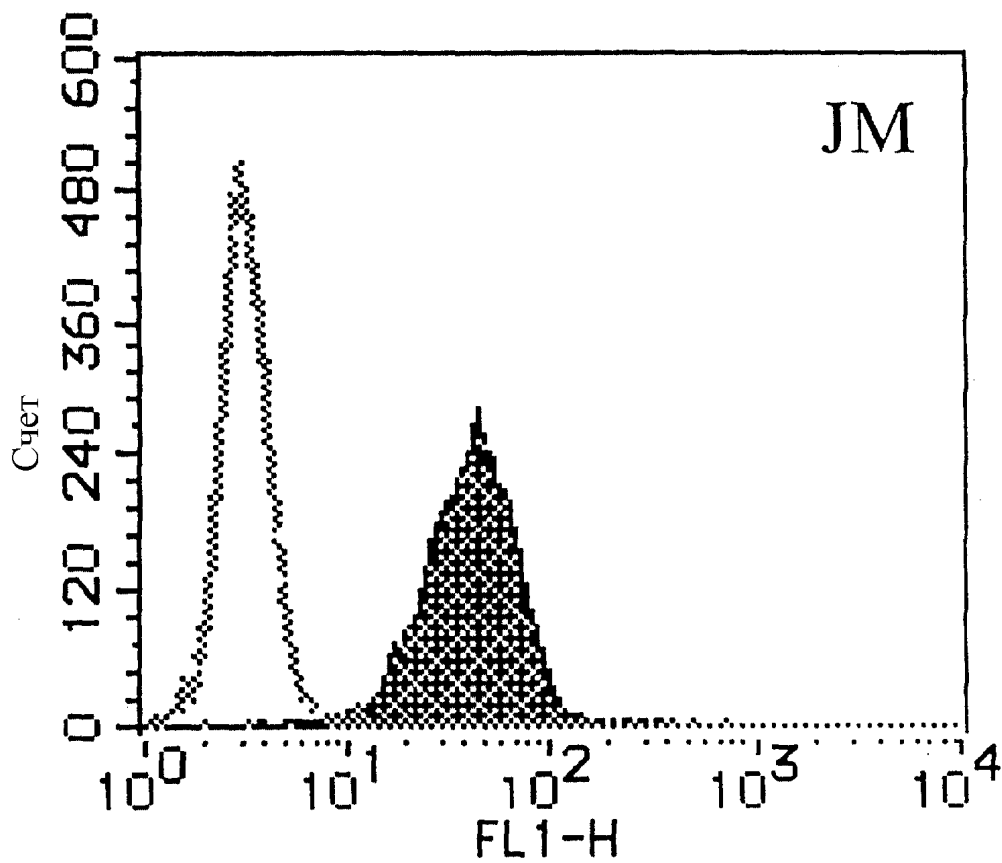


Фиг.13

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

RU 2 1 7 7 8 0 5 C 2

T-5

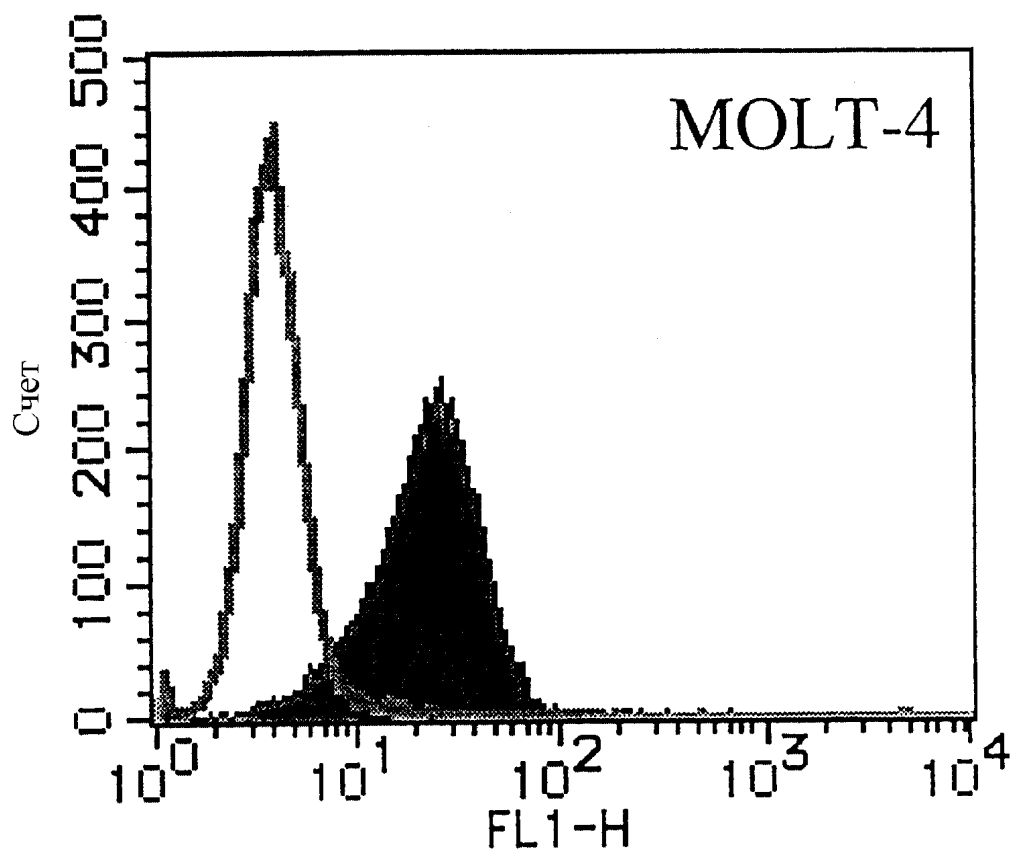


Фиг. 14

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

T-6

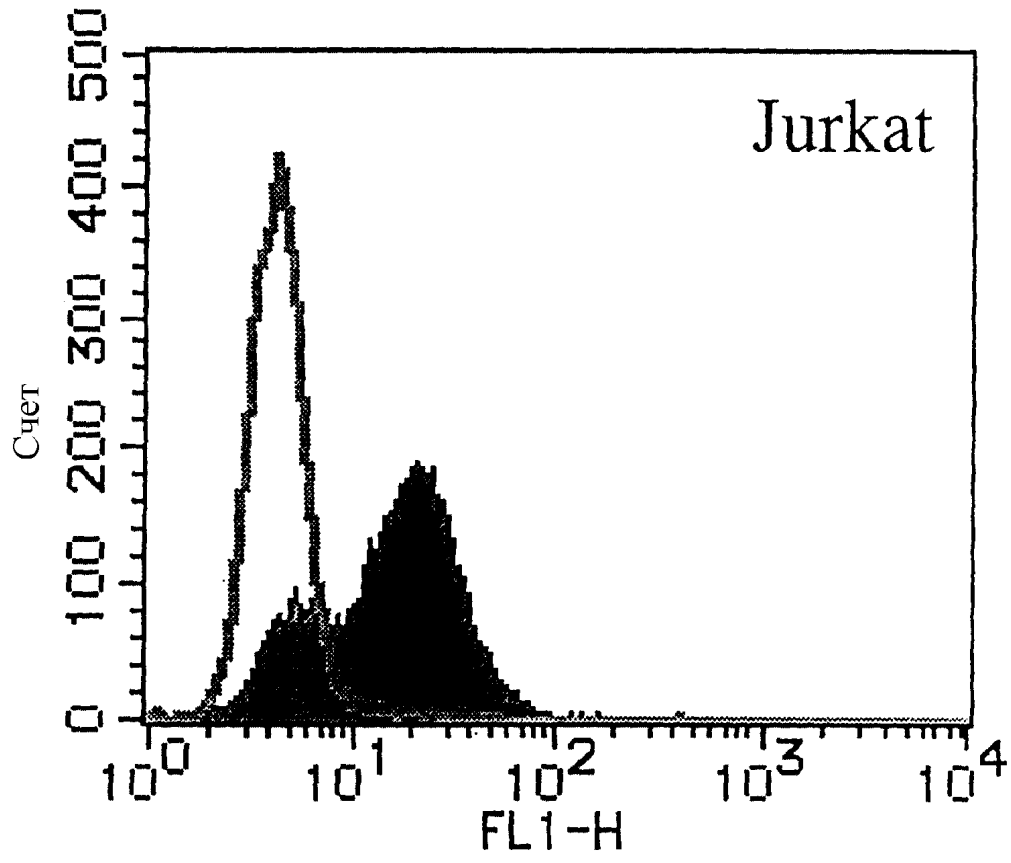


Фиг.15

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

T-7

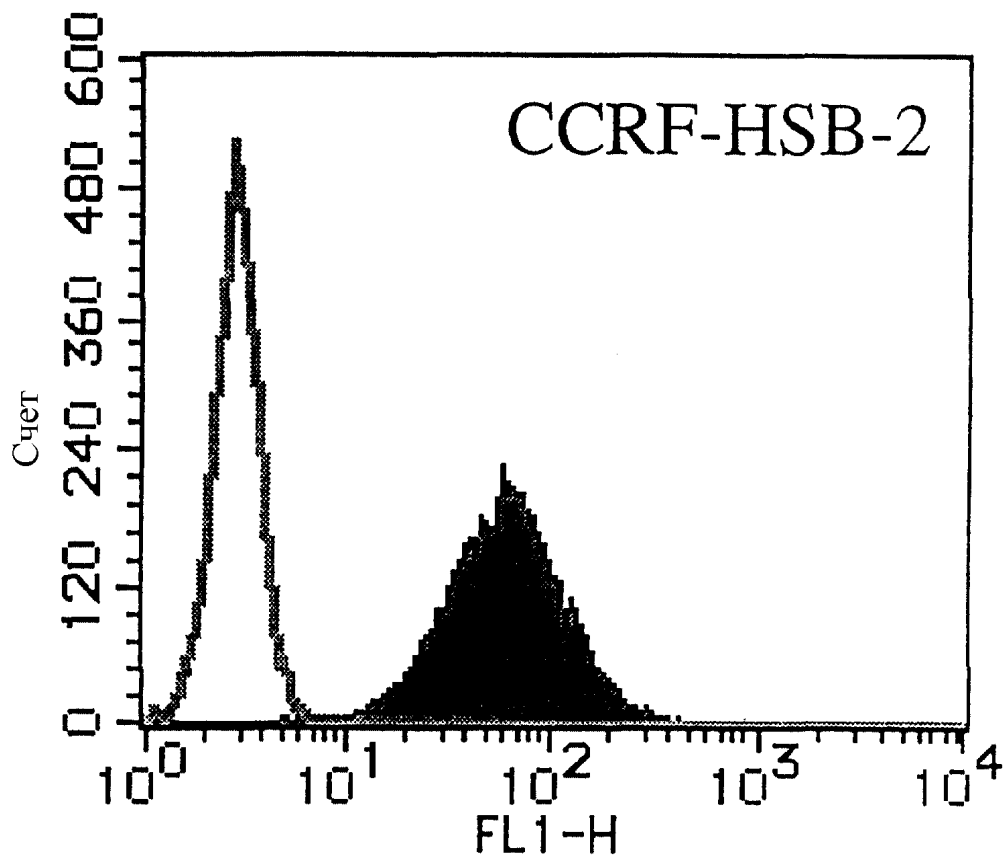


Фиг.16

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

T-8

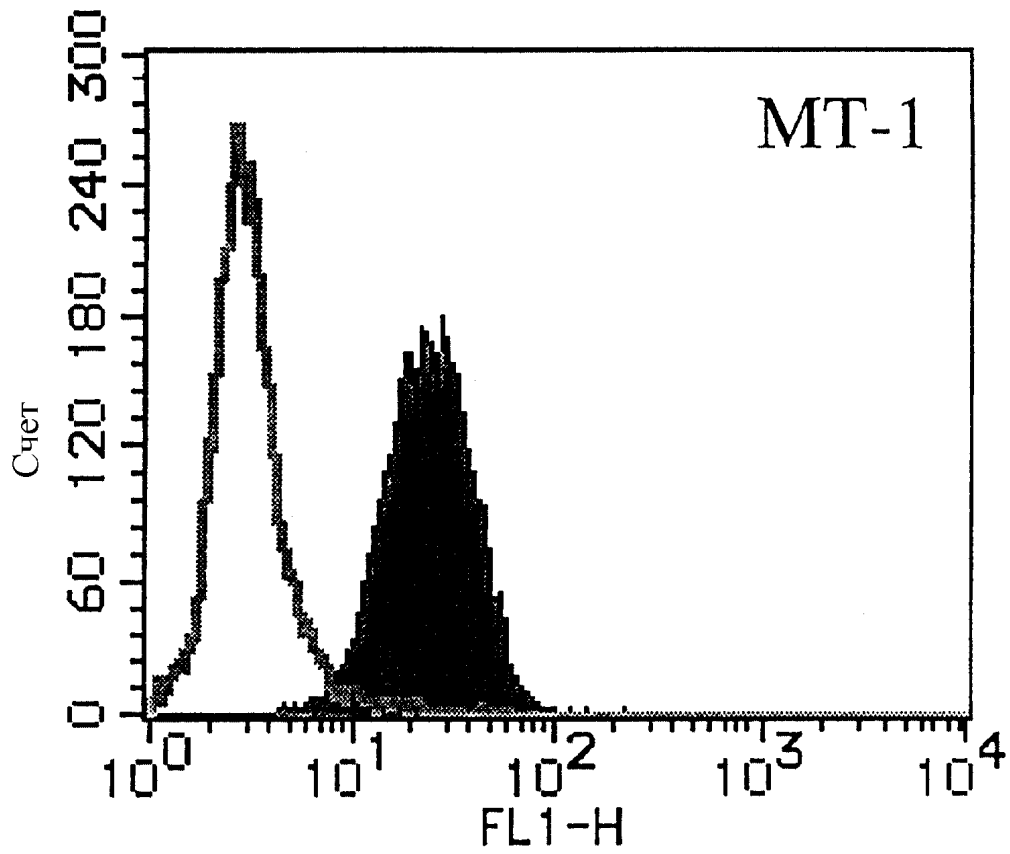


Фиг.17

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

T-9

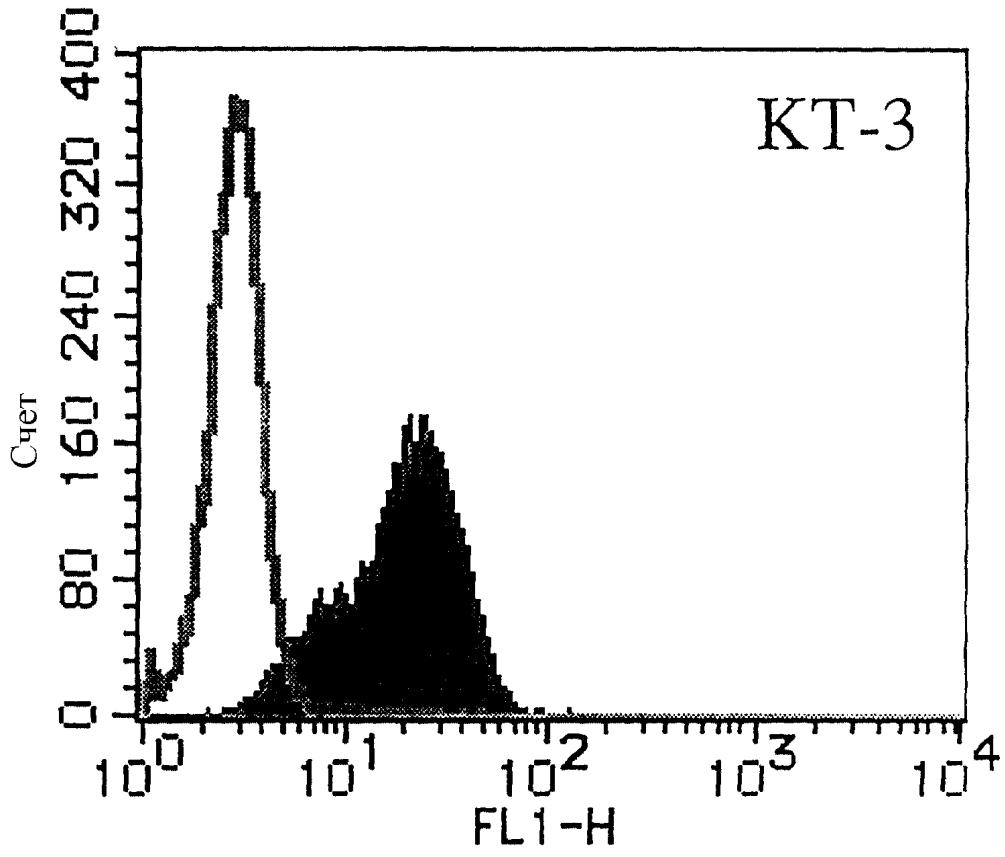


Фиг.18

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

T-10



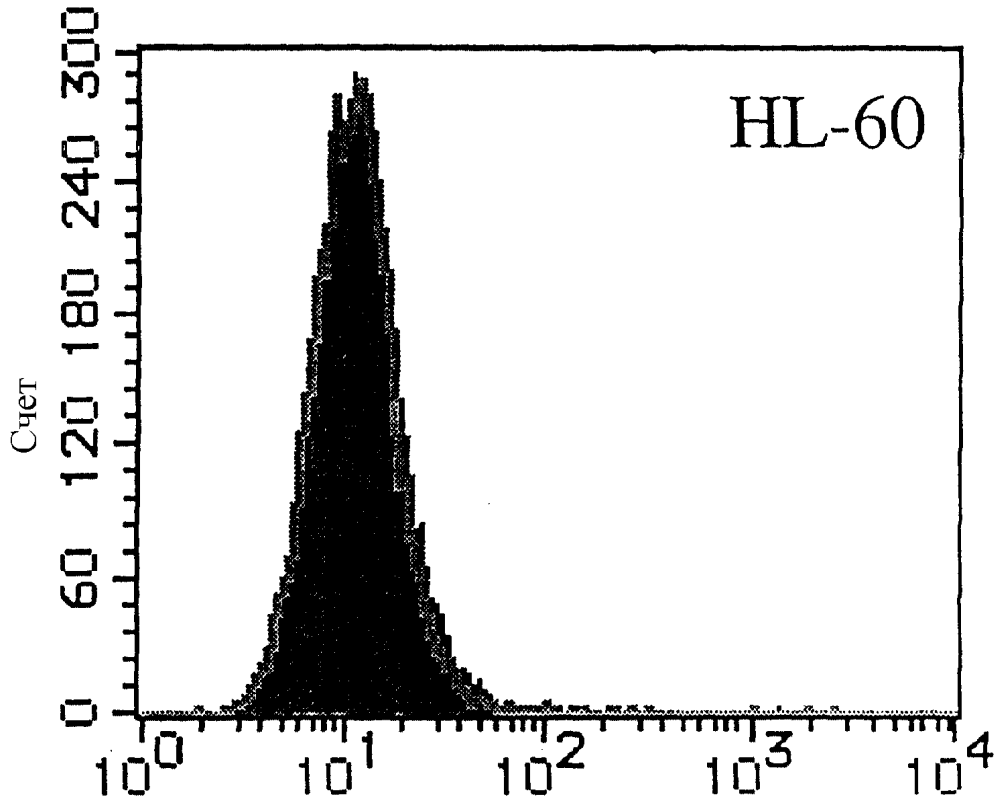
Фиг.19

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

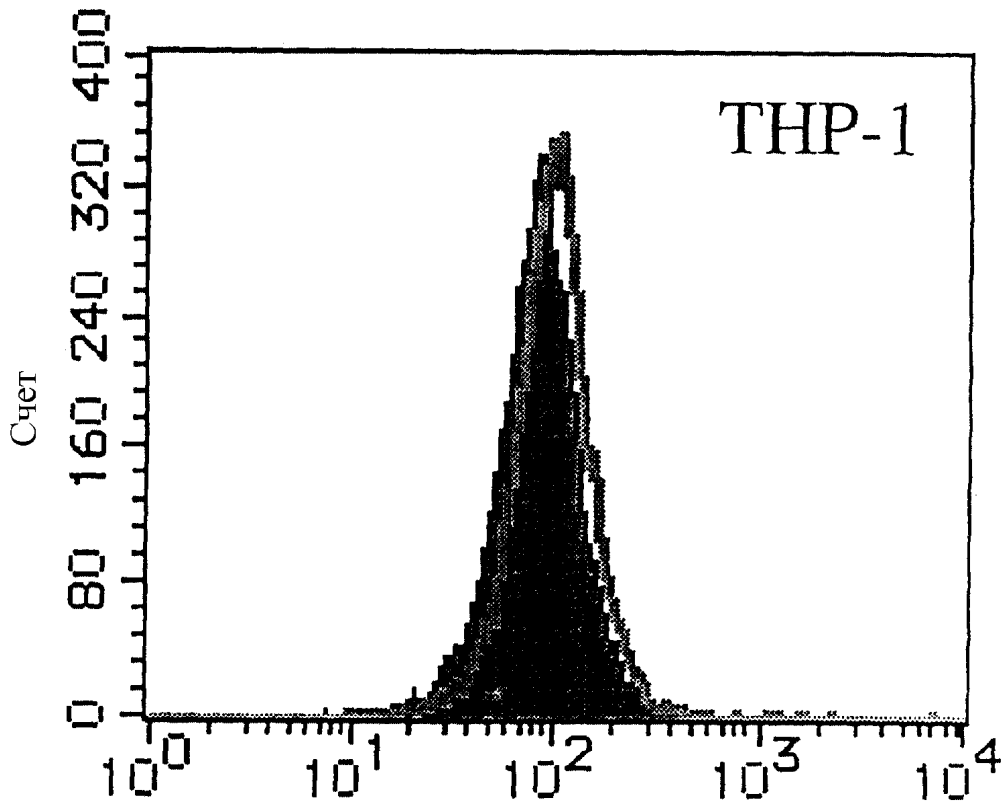


N-1



Фиг.20

N-2

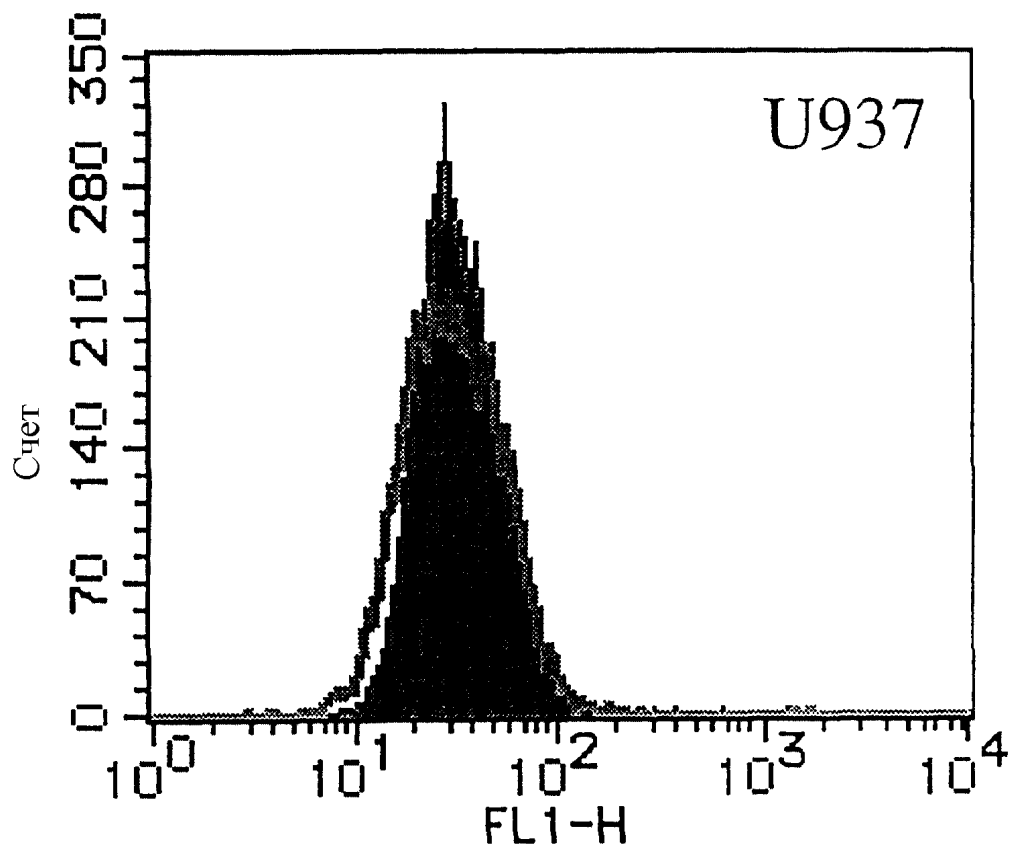


Фиг.21

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

N-3

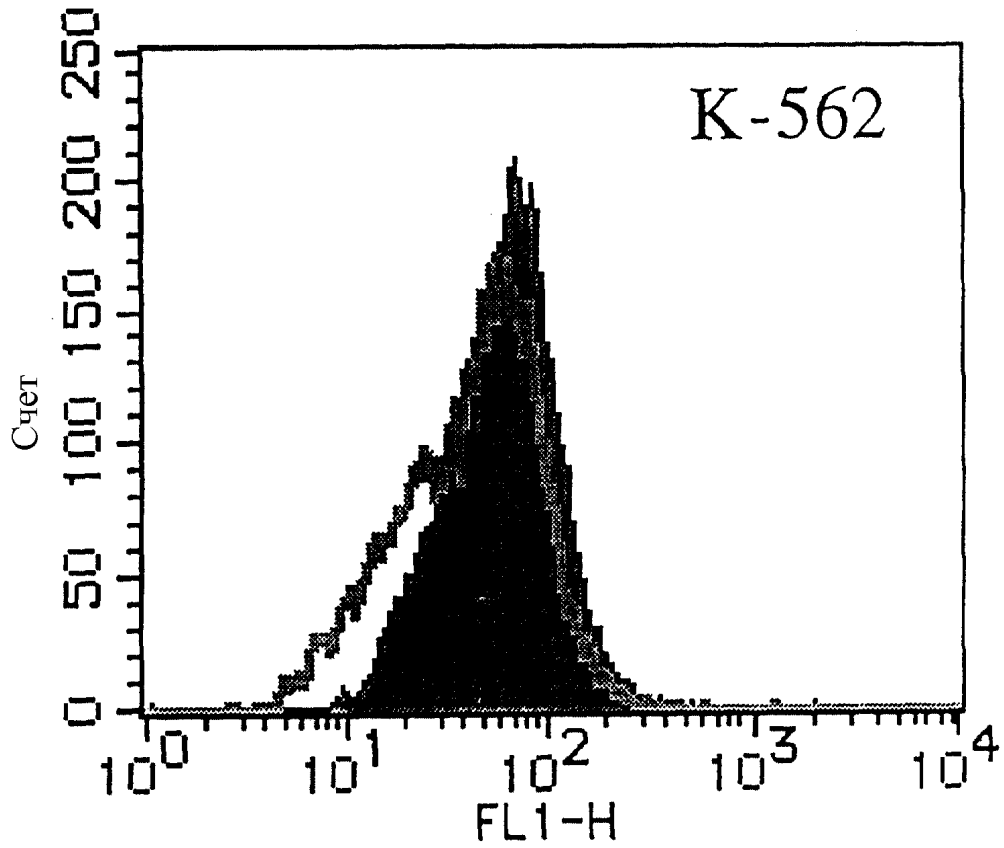


Фиг.22

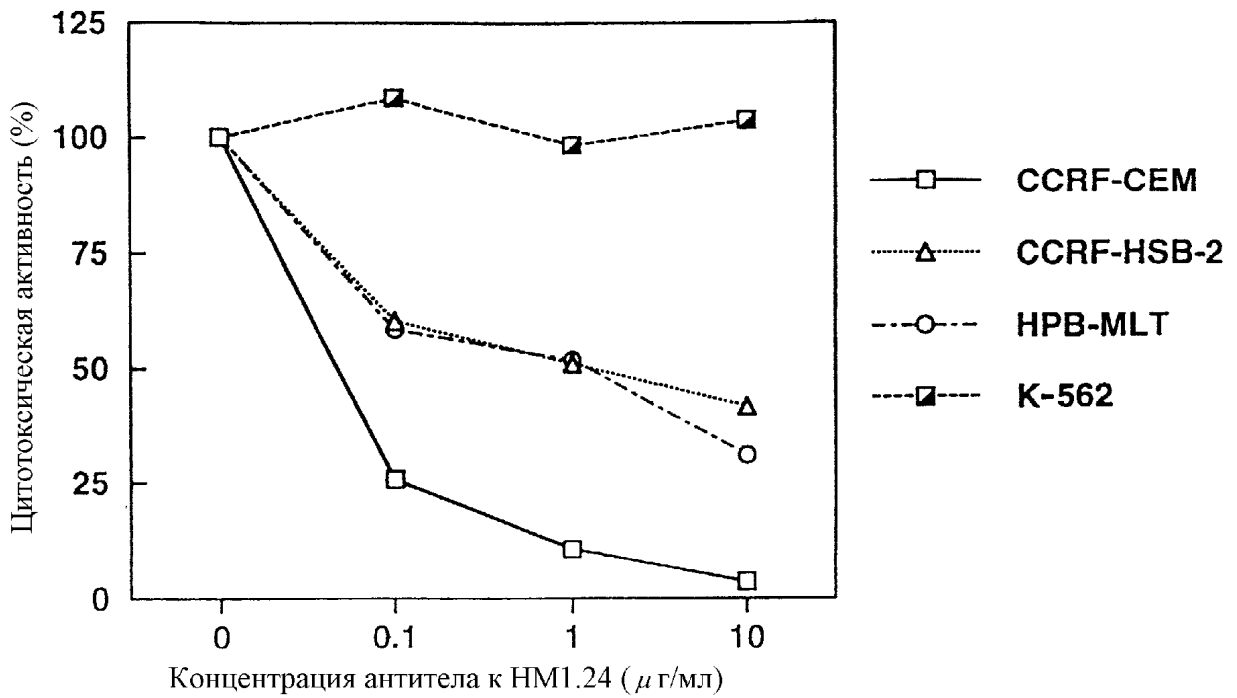
RU 2177805 C2

RU 2177805 C2

N-4



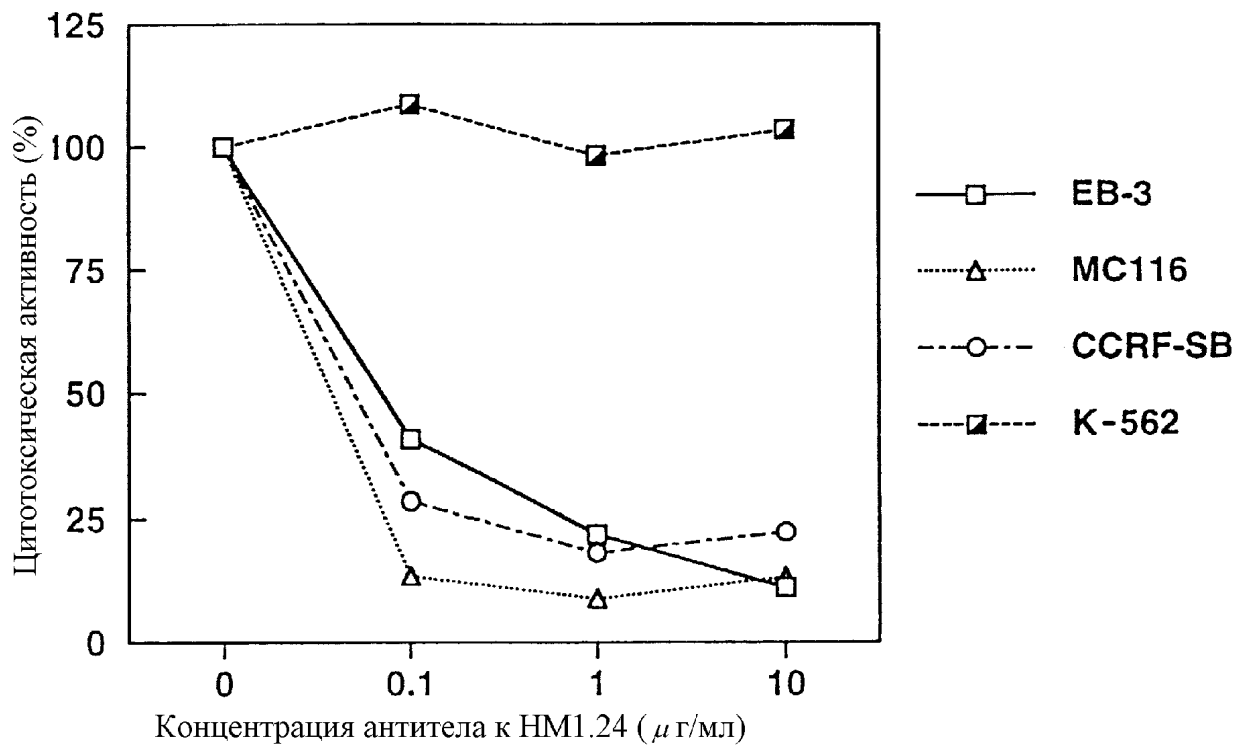
Фиг.23



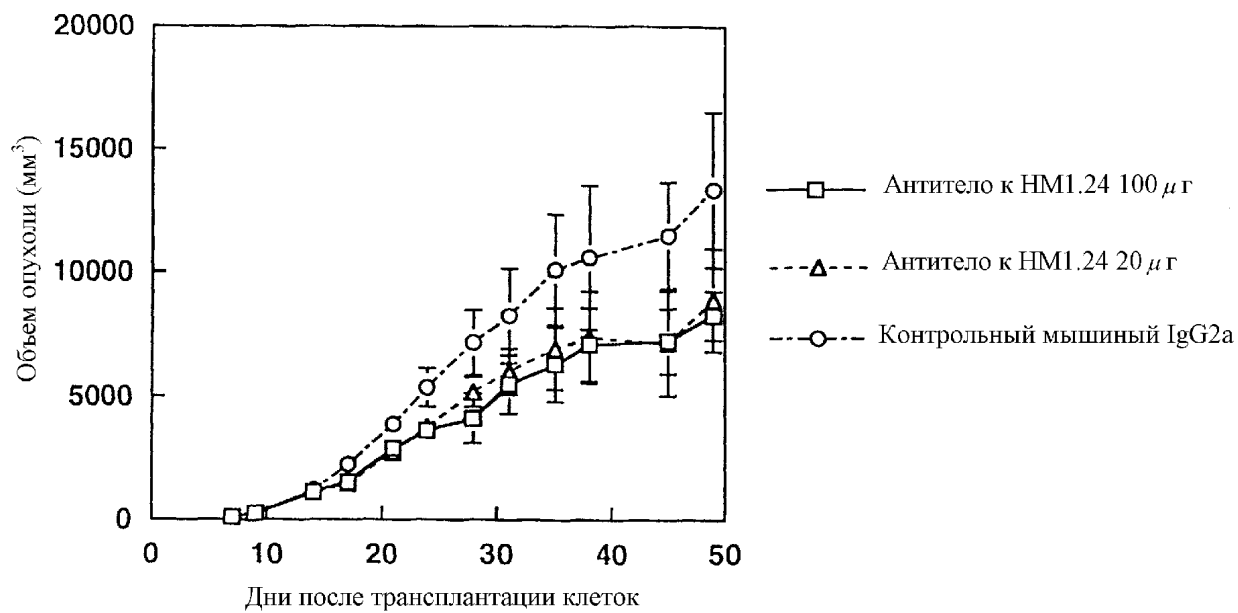
Фиг.24

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2



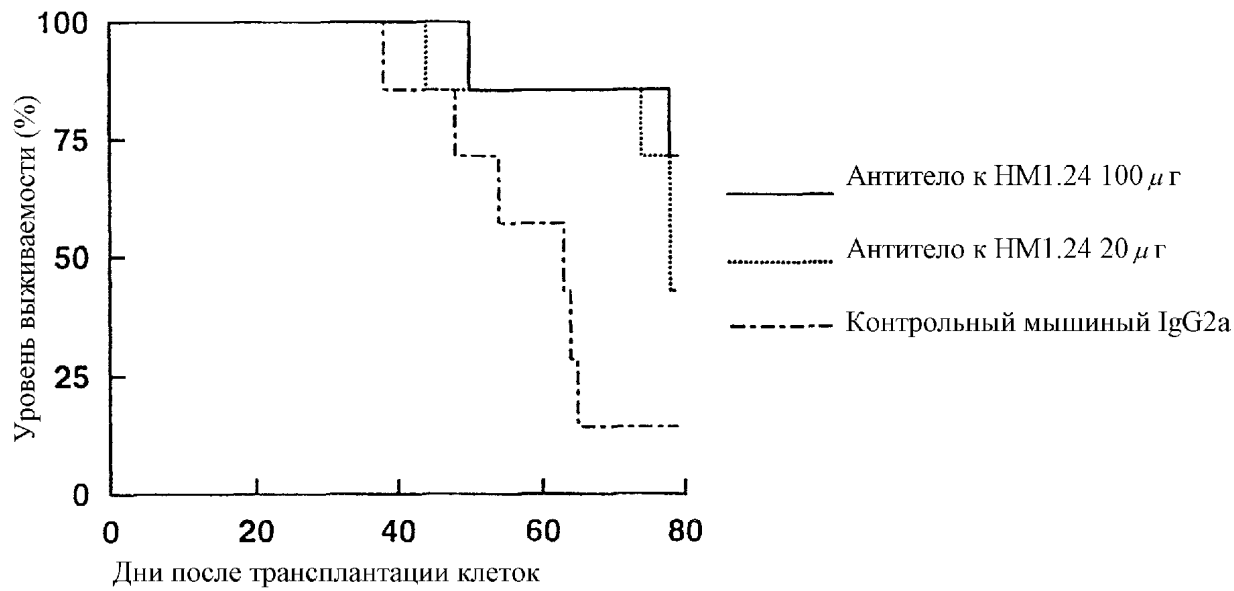
Фиг.25



Фиг.26

RU 2177805 C2

RU 2177805 C2



Фиг.27