

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) **BG**

(11) **65034 B1**

(51) Int.Cl.

C 07 K 16/00 (2006.01)



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

- (21) Регистров № 104828  
(22) Заявено на 05.10.2000  
(24) Начало на действие  
на патента от: 22.04.1999

Приоритетни данни

- (31) 98107925.4 (32) 30.04.1998 (33) EP
- (41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 9 на 28.09.2001  
(45) Отпечатано на 29.12.2006  
(46) Публикувано в бюлетин № 12  
на 29.12.2006  
(56) Информационни източници:  
US 5059523; WO1993/005804

- (62) Разделена заявка от рег. №

- (73) Патентоприетжател(и):  
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIO-  
NAL GMBH, D-55216 INGELHEIM, BINGER  
STRASSE 173 (DE)**

- (72) Изобретател(и):  
**John Edward Park  
Biberach  
Pilar Garin-Chesa  
Biberach  
Uwe Bamberger  
Ochsenhausen  
Wolfgang J. Rettig  
Biberach/Riss (DE)  
Olivier Leger  
Annemasse (FR)  
Jose William Saldanha  
Enfield, Middlesex (GB)**

- (74) Представител по индустриална  
собственост:  
**Георги Цветанов Перев, 1124 София,  
ул. "Леонардо да Винчи" 3**

- (86) № и дата на РСТ заявка:  
**РСТ/EP1999/002711, 22.04.1999**

- (87) № и дата на РСТ публикация:  
**WO1999/057151, 11.11.1999**

**(54) FAP АЛФА-СПЕЦИФИЧНО АНТИТЯЛО С ПОДОБРЕНА ПРОИЗВОДИМОСТ**

(57) Протеините на рекомбинантни антитела специфично свързват протеин  $\alpha$  за активиране на фибробласти (FAPалфа) и включват рамкова модификация, подобряваща продуктивността в клетките гостоприемници. Изобретението се отнася и до приложението на посочените антитела за диагностични и терапевтични цели, както и до методи за тяхното получаване.

7 претенции, 4 фигури

**BG 65034 B1**

## (54) FAP АЛФА-СПЕЦИФИЧНО АНТИТЯЛО С ПОДОБРЕНА ПРОИЗВОДИМОСТ

### Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до протеини на антитела, които специфично свързват протеин алфа за активиране на фибробласти (FAPалфа). Изобретението се отнася, също така, до методи за получаване на тези антитела.

### Предшестващо състояние на техниката

Инвазивният растеж на рак на епитела се свързва с известен брой характерни клетъчни и молекулни промени в поддържащата строма. Силно показателна молекулна характеристика на реактивната строма на много видове рак на епитела е индуцирането на протеин алфа за активиране на фибробласти (от сега нататък ще бъде отбелязван с FAP алфа), молекулите от клетъчната повърхност на реактивни фибробласти на стромата обикновено се идентифицират с моноклонално антитяло F19 (Garin-Chesa P., Old L. J. and Retting W. J. (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers, Proc. Natl. Acad., Sci. 87:7235). Тъй като FAP антигенът се експресира селективно в стромата на известен брой карциноми на епитела, независимо от местоположението и хистологичния тип, разработена е FAP-насочваща стратегия за изобразяване, диагностика и лечение на рак на епитела, както и за някои други състояния. За тази цел се развива антитяло, наречено F19, специфично свързващо FAPалфа и описано в патент на US 5,059,523 и WO 1993/005804, които са включени в настоящото като литературна справка в тяхната цялост.

Сериозен проблем, който възниква при използване на нечовешки антитела за *in vivo* прилагане върху хора, е това че те бързо провокират човешки антигичовешки отговор, който намалява ефикасността на антитялото в пациентите и пречи на непрекъснатото прилагане. Хуманизирането на нечовешки антитела обикновено се постига по един от два начина:

1) чрез конструиране на нечовешки/човешки химерни антитела, при които нечовешките вариабилни области са прикрепени към чо-

вешки константни области (Boulianne G.L., Hozumi N. and Shulman, M.J. (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody Nature 312:643) или

- 2) чрез присаждане на комплементарните детерминантни области (CDRs) от нечовешките вариабилни области на човешки вариабилни области, след което се съединяват тези "реконструирани човешки" вариабилни области към човешки константни области (Riechmann L., Clark M., Waldmann N. and Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332:323). Химерни антитела, въпреки че са по-добри от миши антитела могат все пак да предизвикват антимиши отговор у хора (LoBuglio A.F., Wheeler R.H., Trag J., Hajnes A., Rogers K., Harvey E.B., Sun L., Ghrayeb J and Khazaeli MB. (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:4220). CDR-присадени или реконструирани човешки антитела съдържат малко или не съдържат протеинови последователности, които могат да се идентифицират като произлезли от миши антитела. Въпреки че едно антитяло, хуманизирано чрез CDR-присаждане може все още да бъде способно да предизвика известни имунни реакции, като антиалотипен или антиидиотипен отговор, както се вижда даже с естествените човешки антитела, CDR-присаденото антитяло би било значително по-малко имуногенно, отколкото мише антитяло, като по този начин се позволява по-продължително лечение на пациентите.

Друго сериозно ограничение, свързано с търговското използване на антитела за диагностициране, изобразяване и терапия е тяхната производимост в големи количества. В много случаи рекомбинантната експресия на нативни, химерни и/или CDR-присадени антитела в системи на клетъчни култури е слаба. Фактори, допринасящи за слабата производимост, могат да включват избора на лидерни последователности и избора на клетки гостоприемници за продуциране, така както и неправилно нагъване и намалена секреция. Неправилното нагъване може да доведе до слабо сглобяване на тежката и леката вериги или транспортно некомпетентна трансформация, която забранява секретирането на една или две вериги. Обикновено се приема, че L-веригата придава способността за

секретиране на сглобения протеин. При някои случаи, множествени или даже единични замествания могат да доведат до повишена производителност на антитела.

Поради клиничното значение на специфичното имунологично насочване *in vitro* и *in vivo* на специфични антигени свързани със заболявания за диагностициране и терапия на хора, съществува растяща нужда от антитела, комбиниращи характеристиките на антигенна специфичност, и висока производителност.

Следователно, проблемът подчертаващ настоящото изобретение е да се предоставят протеини на антитела, които комбинират свойствата на специфично свързване към FAP, ниска имуногенност при хора, и висока производителност в рекомбинантни системи.

#### Техническа същност на изобретението

Техническият проблем се решава чрез вариантите за изпълнение на изобретението, охарактеризирани в патентните претенции.

Настоящото изобретение предоставя нови протеини на антитела, притежаващи комплементарните детерминантни области на моноклоналното антитяло F19 (ATCC Accession No. HB 8269), като тези протеини на антитялото специфично се свързват към протеина за активиране на фибробласти (FAP), характеризирани се с това, че те притежават рамкови модификации, водещи до подобрената производителност в клетки гостоприемници, в сравнение с химерни антитела, притежаващи вариабилните области на F19 и чужди константни области.

Както се използва в настоящото, "протеин на антитяло" е протеин със специфичност за свързване на антигена на моноклонално антитяло.

Под "комплементарни детерминантни области на моноклонално антитяло", се подразбира, че са тези аминокиселини, които са включени в специфичното свързване на антигена, съгласно Kabat (Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological interest (5<sup>th</sup> Ed.) NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.) във връзка с Chothia and Lesk (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-

917).

Както се използва в настоящото, терминът "рамкови модификации" се отнася до промяната, делеция или прибавяне на единична или множество аминокиселини във вариабилните области, заобикалящи отделните комплементарни детерминантни области. Рамковите модификации могат да имат за цел имуногенността, производителността или, специфичността на свързване на протеина на антитялото.

"Протеинът за активиране на фибробласти (FAP)", означен също като протеин алфа за активиране на фибробласти (FAP<sub>α</sub>), е гликопротеин свързан с мембраната, принадлежащ на генното семейство на серин-протеазите (WO 1997/034927). Не е известна разпръснатата или секретирана форма на FAP. FAP може да се охарактеризира чрез свързването му към моноклонално антитяло F19 (F19 може да се получи от хибридомна клетъчна линия с номер на депозиране No HB 82659, депозирана в ATCC).

Терминът "специфично свързване на протеин за активиране на фибробласти" на протеина на антитяло се дефинира в настоящото чрез неговата способност специфично да разпознава и да свързва човешка клетъчна линия експресираща FAP. Специфичността на свързване на протеините от изобретението може да се определи чрез стандартни методи за определяне на специфичността на свързване, като описаните по примерен начин в примери 6, 8 и 12.

За да се предоставят протеините на антитялото от настоящото изобретение, последователностите на нуклеиновите киселини на гените на тежките и леките вериги на мише антитяло, означено като F19 се определят от РНК, екстрахирана от F19 хибридомни клетки (ATCC номер на депозиране No. HB 8269).

Неочаквано бе открито, че някои рамкови модификации на вариабилната област на леките вериги определят една подобрена продуктивност на протеините на антитялото от изобретението. Изготвят се версии за реконструирани вариабилни области на леката верига, означени като А, В и С, както са описани във фигури 1 до 6.

Вариабилните области на леката верига А, В и С проявяват значително подобрена производителност в СНС) клетки (виж пример 11). Докато версиите А и С на вариабилните области на леката верига се различават от верига В на

вариабилната област на леката верига единствено по два общи аминокиселинни остатъка, те показват даже и друго значително подобрене на производимостта. Съществува още поне 10 пъти разлика при нивата на секреция на антитялото между човешкото реконструирано F19 лека верига версия В и версии А или С. Реконструираната човешка F19 лека верига версия А и В се различават единствено по два остатъка от тяхната аминокиселинна последователност в позиции 36 (Тур на Phe мутация) и 87 (Тур на Asp мутация) (номенклатура съгласно Kabat). Този отрицателен ефект върху секретирателната способност на антитела, съдържащи вариабилната област на леката верига версия В биха могли да бъдат индиректни, ако Тур в Asp и Тур в Phe мутации, разглеждани индивидуално или заедно, често причиняват неправилно напъване на протеина. Но не е вероятно това да е случаят, тъй като опитите за свързване на антигена показват, че имуноглобулините съдържащи F19 лека верига версия В имат подобен афинитет (avidity) на тези сдвоени с F19 лека верига версия А или С, което подсказва, че са били много грешно нагънати.

Следователно, при един вариант за изпълнение, настоящото изобретение се отнася до протеини на антитяло, които съдържат вариабилната област на леката верига, както е посочено по-горе в SEQ ID NO: 2.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до няколко различни вариабилни области на тежката верига, които работят изключително добре с вариабилните области на леката верига версии А и С, за подобряване на производимостта.

При един вариант за изпълнение, настоящото изобретение се отнася до протеини на антитяло, които съдържат вариабилната област на тежката верига, както е посочено в коя да е от SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14.

При един характерен вариант за изпълнение, настоящото изобретение се отнася до протеини на антитяло, съдържащи вариабилната област на леката верига, както е посочено по-горе на SEQ ID NO: 2 и вариабилната област на тежката верига, както е показано на SEQ ID NO: 12. По-предпочитано, протеинът на антитялото съдържа константната област на леката верига, посочена на SEQ ID NO: 20 и констант-

ната област на тежката верига, както е посочено на SEQ ID NO: 22.

Следователно, един друг аспект на настоящото изобретение е протеин на антитяло, съдържащ аминокиселинна последователност показана на SEQ ID NO: 2. За предпочитане, един такъв протеин на антитяло съдържа също и аминокиселинна последователност посочена на SEQ ID NO: 12. По-предпочитано, протеин на антитяло съдържа също аминокиселинна последователност посочена на SEQ ID NO: 20 и аминокиселини\*) последователност посочена на SEQ ID NO: 22. Друг аспект на изобретението е протеин на антитяло, както е описан в този абзац, който е конюгиран към радиоизотоп, за предпочитане  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ , или  $^{90}\text{Y}$ . Един допълнителен аспект на настоящото изобретение е ДНК молекула, кодираща протеин на антитяло, както е описан в този абзац. Друг аспект на изобретението е клетка гостоприемник, пренасяща такава ДНК молекула. Съгласно това, един друг аспект на изобретението е метод за получаване на протеин на антитяло, включващ етапите на култивиране на такива клетки гостоприемници при условия, при които посоченият протеин на антитяло се експресира от посочените клетки гостоприемници, и изолиране на посочения протеин.

При един друг конкретен вариант за изпълнение, изобретението се отнася до протеини на антитяло, съдържащи вариабилната област на леката верига, както е посочено на SEQ ID NO: 2 и вариабилната област на тежката верига, както е посочено на SEQ ID NO: 8.

Хуманизирането на вариабилната област на мишето антитяло може да се постигне при използване на методи, известни от състоянието на техниката. EP 0239400 описва присаждане на CDRs от миша вариабилна област в рамка на човешка вариабилна област. WO 1990/007861 описва методи за реконструиране на CDR-присадена вариабилна област чрез въвеждане на допълнителни рамкови модификации. WO 1992/011018 описва методи за получаване на хуманизиран Ig, комбиниращ донорни CDRs с акцепторна рамка, притежаваща висока степен на хомоложност с донорната рамка. WO 1992/005274 описва приготвянето на антитела с мутирала рамка, започващи от мише антитяло. Друга литературна справка, отнасяща се до хуманизиране на ми-

пи моноклонални антитела са EP 0368684; EP 0438310; WO 1992/007075 или WO 1992/022653. Така, експертът може да получи антителата на настоящото изобретение, като се започне от мише моноклонално антитяло F19, достъпно за обществеността, и при използване на техники известни от състоянието на техниката, например, от WO 1992/005274. ДНК молекули кодиращи за протеините на антитялото от настоящото изобретение могат също така, да се получат чрез синтетични процедури, например чрез химичен синтез на подходящи олигонуклеотиди и последващо лигиране и амплифициране (виж e. g. Frank et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 221-249).

Друг аспект на настоящото изобретение се отнася до рекомбинантен ДНК вектор, съдържащ нуклеотидна последователност на която и да е от горепосочените нуклеинови киселини, по-специално когато тази нуклеотидна последователност е операционно свързана към експресионна контролна последователност като експресионни вектори. Предпочита се рекомбинантен ДНК-ов вектор, като посоченият вектор е експресионен вектор.

Друг аспект на настоящото изобретение е клетка гостоприемник, пренасяща вектор като описания, по-специално експресионен вектор. Такава клетка гостоприемник може да бъде прокариотна клетка или еукариотна клетка. За предпочитане, такава клетка гостоприемник е еукариотна клетка, дрождева клетка или клетка от бозайник.

В съответствие, един аспект на настоящото изобретение, е метод за получаване на протеини на антитела, съгласно изобретението. Един такъв метод включва етапите на:

А) култивиране на клетките гостоприемник, както е описано по-горе, или условия, при които посоченият протеин на антитялото се експресира в посочената клетка гостоприемник, и

Б) изолиране на посочения протеин на антитялото.

Протеините на антителата на изобретението предоставят силно специфично средство за насочване на терапевтични средства към FAP антигена. Следователно, при един друг аспект изобретението се отнася до протеини на антитела, съгласно изобретението, при което посоченият протеин на антителата са конюгирани към

терапевтичното средство. Измежду многобройните терапевтични средства, известни от състоянието на техниката, предпочитани са протеини на антитела избрани от група, състояща се от радиоизотопи, токсини, токсиди, инфламатогенни средства, ензими, антисенс молекули, пептиди, цитокини и хематотерапевтични средства. Измежду радиоизотопите, гама, бета и алфа-излъчващи радиоизотопи могат да се използват като терапевтични средства, бета-излъчващи радиоизотопи са за предпочитане като терапевтични радиоизотопи. За <sup>186</sup>рений, <sup>180</sup>рений, <sup>131</sup>йод и <sup>90</sup>итрий е доказано, че са изключително полезни бета-излъчващи изотопи, за постигане на локализирано облъчване и унищожаване на злокачествени туморни клетки. Следователно, радиоизотопи избрани от група, състояща се от <sup>186</sup>рений, <sup>188</sup>рений, <sup>131</sup>йод и <sup>90</sup>итрий, изключително предпочитани като терапевтични средства, конюгирани към протеини на антитела на изобретението, могат да се използват в метод като описания в WO 1993/005804.

Друг аспект на настоящото изобретение се отнася до протеини на антитела, съгласно изобретението, характеризиращи се с това, че те са конюгирани към изобразяващи се средства. От състоянието на техниката са известни голямо разнообразие от изобразяващи се средства, по-специално радиоизотопи. За осъществяване на изобретението се предпочитат гама-излъчващи изотопи. По-предпочитан е <sup>125</sup>йод.

Един аспект на настоящото изобретение се отнася до фармацевтични състави, съдържащи протеини на антитела съгласно настоящото изобретение, както е описано по-горе и фармацевтично приемливи носители. Таква фармацевтични състави се използват за лечение на тумори, като посочените тумори се свързват и активирани стромални фибробласти. Съществуват два възможни принципа за действие при антитуморна стройна имунотерапия, които могат да действат синергично: а) немодифицирано (неконюгирано, "голо") антитяло, съгласно изобретението може да индуцира разрушаване на имунитета или възпалителни реакции в стромата на тумора, докато б) антитяло конюгирано към терапевтично средство, като например, радиоизотоп или друго токсично вещество може да постигне локализирано облъчване и разрушаване на злокачествените туморни клетки.

### Описание на фигурите

Фигура 1. Аминокиселинна последователност на F19 човешка реконструирана вариабилна област на лека верига версия А (hF19L<sub>A</sub>) SEQ ID NO: 2.

Фигура 2. Аминокиселинна последователност на F19 човешка реконструирана вариабилна област на тежка верига версия С (hF19H<sub>C</sub>) SEQ ID NO: 12. Аминокиселините отличаващи се от версия А са подчертани и с удебелени букви.

Фигура 3. Аминокиселинна последователност на човешка лека константна верига SEQ ID NO: 20.

Фигура 4. Аминокиселинна последователност на човешка тежка константна верига SEQ ID NO: 22.

### Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. Конструирание на миши-човешки химерни гени

Химерното F19 (сF19) антитяло се проектира да притежава миши F19 V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> области, свързани към човешки капа и гама-1 константни области, съответно. PCR праймери се използват за модифициране на 5'- и 3'- последователности, ограничаващи сДНК последователностите, кодиращи миши F19 V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> области (таблица 1). Проектират се PGR праймери специфични за F19 лека верига V-област. Тези адаптирани миши F19 вариабилни области след това се клонират в експресионни вектори за клетки на бозайници, които вече съдържат човешки капа (pKN100 вектор) и гама-1 (pG1D105 вектор) константни области (фигура 23). Тези вектори използват човешкия цитомегаловирус (HCMV) промотор/инхансер за ефикасно транскрибиране на леката и тежката вериги. Векторите съдържат също SV4С) начало на репликация, за да се позволи ефикасна ДНК репликация и последваща експресия на протеина в COS клетки. Експресионните вектори се проектират да притежават вариабилни области инсерирани като HindIII-BamHI ДНК фрагменти. Конструират се PCR праймери, които да въвеждат тези рестрикционни сайтове при 5'-(HindIII) и 3'-(BamHI) краищата на сДНК кодиращи V-областите. Освен това се конструират PCR праймери, които да въвеждат Kozak последователност (GCCGCCACC) при 5' кра-

ищата на двете сДНК, леката и тежката вериги, което да позволи трансляция (Kozak ML: At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance transmission in mammalian cells. (19BY) J. Mol. Biol. 196: 974), и въвеждане на донорни сайтове за снаждане при 5' краищата на двете сДНК, леката и тежката вериги, за вариабилни области, които трябва да се снадят към константните области. PCR праймери, използвани при конструирането на химерните F19 лека и тежка вериги са показани на таблица 1, ДНК и аминокиселинните последователности на миши F19 V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> области, както са адаптирани за използване при конструирането на химерните F19 лека и тежка вериги са показани на фигури 24 и 25. ДНК последователностите на миши F19 лека и тежка вериги, клонирани в еукариотни експресионни вектори pKN100 и pG1D105, съответно, са показани на фигури 26 и 27.

Таблица 1. PCR праймери за конструирание на химерно F19 антитяло А. Вариабилна област на лека верига

1. Праймер за конструирание на 5'-край (37-мер)

5' CAGA AAGCTT GCCGCCACC ATG GAT TCA GAG GCC CAG 3'

HindIII Kozak последов. M D S Q A Q

2. Праймер за конструирание на 3'-край (35-мер)

5' CCGA GGATCC ACTCACGTTT CAG CTC GAG CTT GGT 3'

BamHI донорен сайт за снаждане

В. Вариабилна област на тежка верига

1. Праймер за конструирание на 5'-край (37-мер)

5' CAGA AAGCTT GCCGCCACC ATG GGA TGG AGC TGG GTC 3'

HindIII Kozak последов. M G W S W V

2. Праймер за конструирание на 3'-край (35-мер)

5' CCGA GGATCC ACTCAC TGA GGA GAG GGT GAC TGA 3'

BamHI донорен сайт за снаждане.

Пример 2. Експресионна и свързваща активност на химерно F19 антитяло

Двете плазмидни ДНК, кодиращи химерните F19 лека и тежка вериги (виж пример 1) се котрансфектират в COS клетки да търсят временна експресия на химерните F19 лека и теж-

ка вериги, описани по-долу. След 72 h инкубиране средата се събира, центрофугира се за отстраняване на клетъчните отломки и се анализира чрез ELISA за продуциране на човешко IgG1-подобно антитяло. Супернатантата на COS клетките, съдържаща химерното F19 антитяло се анализира за способността ѝ да се свързва към HT 1080 клетки (виж пример 13) експресиращи FAP антигена на повърхността си.

Трансфекция на COS клетки при използване на електропорация

Експресионни вектори за бозайници pg1d105 и рKN100, съдържащи химерни или реконструирани версии на човешки тежки и леки вериги, съответно, се тестват в COS клетки, като се търси преходна експресия на F19 антитела. Прави се рутинен пасаж на COS7 клетки в DMEM (Gibco BRL cat. # 41966), съдържаща пеницилин (50 IU/ml), стрептомицин (50 microg/ml), L<sup>TM</sup> глутамин и 10% топлинно инактивиран зародишен телешки серум без гама глобулин (PCS, Harlan Sera-Lab cat. # D0001). ДНК се въвежда в COS клетките чрез електропорация при използване на Gene Pulsar устройство (BioRad). Прибавя се ДНК (10 microg от всеки вектор) към 0,8 ml аликвотни части  $1 \times 10^7$  клетки/ml в буфериран с фосфат физиологичен разтвор (PBS, без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>). Прилага се импулс от 1 900 V (волта), 25 microF капацитет. След 10 min период за възстановяване при стайна температура клетките, подложени на електропорация се прибавят към 8 ml DMEM, съдържаща 5% FCS. След инкубиране при 37°C в продължение на 72 h, средата се събира, центрофугира се за отстраняване на клетъчните отломки и се съхранява при стерилни условия при 4°C за кратък период от време или при -20°C за по-дълъг период от време.

ELISA метод за измерване концентрацията на присъединено IgG1/капа антитяло в су-

пернатанти на COS клетки

Проби от антитела, продуцирани в трансфектирани COS клетки се изследват чрез ELISA, за да се определи колко химерни или реконструирани човешки антитела са били продуцирани. За определянето на антителата блудата се покриват с кози античовешки IgG (Fcy фрагмент специфичен) антитяло (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., # 109-005-098). Пробите от COS клетки се разреждат серийно и се прибавят към всяка ямка. След инкубиране за 1 h при 37°C и промиване се прибавя пероксидаза от хрян, конюгирана с кози античовешка капа лека верига (Sigma, A-7164). След инкубиране от 30 min при 37°C и промиване се прибавя за 30 min, при стайна температура K-blue субстрат (смес на 3,3', 5,5' тетраметилбензидин и водороден прекис, Bionostics Limited, # KB175). Реакцията се спира при използване на Red Stop разтвор (Bionostics Limited, # RS20) и оптичката плътност се отчита на четящо устройство за микроблюдо при 650 nm. Като стандарт се използва пречистено човешко igG1/капа антитяло (Sigma, I-3889) с известна концентрация.

Експресията на химерно F19 антитяло в COS клетки е слаба (таблица 2), между 10 и 60 ng/ml, което е поне 1С) пъти по-малко отколкото при повечето антитела.

При опит да се увеличат нивата на експресия на химерното F19 антитяло се променя лидерната последователност на F19 VI областта чрез заместване на левцин с пролин при позиция -9. Тази единична промяна на аминокиселина в лидерната последователност води най-малкото до удвояване на количеството химерно антитяло продуцирано в COS клетки.

Резултатите от клетъчното свързване показват, че химерният F19 се свързва специфично и с очакван афинитет към FAP мишената.

Таблица 2. Концентрации на химерно F19 антители в супернатанти на COS клетки (результатите са от три независими трансфекции)

Компоненти на трансфектирани антитела		Човешки $\gamma$ 1 /K
Тежка верига	Капа лека верига	[в mg/ml]
cF19	cF19(F19лидерна последователност)	0,060
cF19	cF19 (F19 мутирала лидерна последователност)	0,212
cF19	cF19(F19лидерна последователност)	0,056
cF19	cF19(F19мутирала лидерна последователност)	0,108
cF19	cF19последователнос	0,011
cF19	(F19 мутирала лидерна последователност)	0,087

Пример 3. Конструирани на реконструирани човешки F19 леки вериги версия А до С ( $L_A - L_B$ )

Конструиранието на първата версия на реконструирана човешка F19  $V_L$  област ( $V_A$ ) се провежда при използване на припокриващи се PCR фрагменти при метод, подобен на този, описан от Daugherty B.L., DeMartinno J.A., Law M.F., Kawka D.W., Singer I.I., and Mark G.E. (1991). Полимеразната верижна реакция (PCR) улеснява интониранието, CDR-присаждане и бърза експресия на мише моноклонално антители, насочено срещу CD18 съставна част на левкоцитарни интегрини. Nucl. Acids Res. 19:2471. Синтезират се 10 олигонуклеотида, което съставя пет двойки праймери, APCR1-vla1, vla2-vla3, vla4-vla5, vla6-vla7 и vla3-APCR4 (таблица 3 и фигура 28). Има една припокриваща последователност от поне 21 бази между съседни двойки (фигура 28). APCR1 и APCR4 хибридизират към граничните pUC19 векторни последователности. Мутагенните праймери се проектират така, че техния 5' край непосредствено следван от непостоянна позиция на кодон. Тази стратегия се използва за противодействие на безпричинно добавяне на един нуклеотид към

3' края на веригата комплементарна на мутагенния праймер чрез ДНК полимераза по време на PCR (Sharrocks A.D. and Show P.E. (1992) Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis. Nucl. Acids Res. 20:1147). Подходящите двойки праймери (0,2 microM от всеки) се комбинират с 10 ng от версия "B" на реконструирана човешка L25V област сДНК и 1 единица AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) ДНК полимераза в 50 micro-l PCR буфер, съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 microM dNTPs, и 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Покрива се с минерално масло и се провежда PCR с 25 цикъла, като всеки цикъл се състои от етап на денатуриране при 94°C за 1 min, етап на хибридиране на праймера при 55°C за 1 min и етап на удължаване при 72°C за 2 min. Следва един цикъл, състоящ се от допълнителен етап на удължаване при 75°C за 10 min, следван от охлаждане до 4°C за 10 min. Времето между хибридирането на праймера и етапите на екстензия е 2,5 min. PCR продуктите от петте реакции (A, B, C, D и E) се пречистват чрез гел електрофореза, последвана от елюиране на ДНК при използване на Wizard PCR preps (Promega). PCR продуктите A, B, C, D и E се сдвояват един



с друг според тяхната комплементарност. При втория комплект от PCR реакции, PCR продукти В и С, и D и Е, (50 ng от всеки) се прибавят към 50  $\mu$ l PCR реакционна смес (както е описано по-горе) всяка, съдържаща една единица AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) ДНК полимераза. Провежда се цикъл на реакцията от 20 цикъла, както е описано по-горе, с тази разлика, че температурата на хибридиране се повишава до 60°C. При третия комплект от PCR реакции, PCR продукти F и G се амплифицират чрез PCR при използване на 1  $\mu$ l от всяка предходна PCR реакция и подходящата двойка PCR праймери (vla2-vla5 или vla6-APCR4). PCR реакциите съдържат една единица AmpliTaq ДНК полимераза в 50  $\mu$ l PCR реакционна смес (както е описано по-горе) и се амплифицират в продължение на 25 цикъла, както първия етап. При четвъртия комплект от PCR реакции, PCR продуктът H се амплифицира чрез PCR при използване на 1  $\mu$ l от всяка предходна PCR реакция и PCR праймерите vla2-APCR4. На края PCR продуктите A и H се сдояват според тяхната собствена комплементарност чрез една двуетапна PCR реакция, подобна на описаната по-горе, при използване на RSP и UP като терминални праймери. Напълно сглобеният фрагмент, представляващ цялата реконструирана човешка F19 V<sub>I</sub> област, включваща лидерна последователност, се смилва с HindIII и BamHI и се клонира в pUC19 за секвениране. Клон, притежаващ правилната ДНК последователност се означава като reshF19La (фигура 29), и се субклонира след това в еукариотен експресионен вектор pKN100. ДНК последователността на reshF19La, клонирана в pKN100 е показана на фигура 30.

Втората версия на реконструирана човешка F19 V<sub>I</sub> област (L<sub>c</sub>) се конструира при използване на същата схема, като описаната за La, но при която vla4 и vla7 праймерите се заместват от vla6 и vla7, съответно (таблица 3). ДНК последователността на Lбета е показана на фигура 29.

Третата версия на реконструирана човешка F19 V<sub>I</sub> област (L<sub>B</sub>) се конструира при използване на кит за QuikChange™ сайт-насочен мутагенез от Stratagene. Методът QuikChange сайт-насочен мутагенез се прилага съгласно препоръките на производителя, при използване на reshF19La в pKN100 вектор като двуверижна

ДНК матрица. Мутагенните олигонуклеотидни праймери F19Lc-сенс и F19Lc-антисенс (Таблица 3) за използване при този протокол се проектират съгласно инструкциите на производителя. Накратко, и двата мутагенни праймера включват желаната точкова мутация (кодон "ТТТ при остатък на Kabat в позиция 49 (Phe) променен на ТАТ кодиращ за Тур) и хибридиран към същата последователност на противоположните вериги на L<sub>A</sub> в pKN100 вектора. Точковата мутация се проверява чрез ДНК секвениране на цялата V<sub>I</sub> област. ДНК последователността на L<sub>c</sub> е показана на фигура 29. За да се елиминира възможността да се получи случайна мутация в pKN100 по време на PCR реакцията, V<sub>I</sub> областта се изрязва от pKN100 като HindII/BamHI фрагмент и се субклонира отново в немодифициран pKN100 вектор, срязан със същите два рестрикционни ензима, по-горе.

Таблица 3. PCR праймери за конструиране на реконструирани човешки F19 V<sub>I</sub> варибилни области на лека верига

1. Праймери за синтезиране на версия "А"

- 25 F19vla1 (36-мер):  
5'GTCATCACAATGTCTCCGGAGGAA  
CCTGGAACCCAG 3'
- F19vla2 (29-мер):  
5' CTCCGGAGACATTTGTGATGACC CA  
30 ATCTC 3'
- F19vla3 (45-мер):  
5'GAATATAAAAGGCTCTGACTGGAC  
TTGCAGTTGATGGTGGCCCTC 3'
- F19vla4 (72-мер):  
35 5'CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGA  
AATCAAAAGAACTACTTG GCCTGGTATCAG  
CAGAAACCAGGACAGCC 3'
- F19vla5 (44-мер):  
40 5' ACCCCAGATTCCCTAGTGCTAGCC  
CAA AAGATGAGGAGTTTGGG 3'
- F19vla6 (67-мер):  
5'TAGCACTAGGGAATCTGGGGTACC T  
GATAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTTGGGA  
CAGACTTCACCCCTC 3'
- F19vla7 (53-мер):  
45 5' GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGA  
TAGCTAAAATATTGCTGA CAGTAATAAAC 3'
- F19vla8 (33-Мер):  
5' GCTCACGTTCCGACAAGGGACCA  
50 AGGTGGAAAT 3

2. Праймери за синтезиране на версия "В"  
 F19v1b4 (72-мер):  
 5'CAGTCAGAGCCCTTTATATCTAGAAAATCAAA  
 AGAACTACTTGGCCTGGTTCCAGCAG AA  
 ACCAGGACAGCC 3'
- F19v1b7 (57-мер):  
 5'GTCCCTTGTCCGAACG1GAGCGGAT  
 AGCTAAAATATTGCTGACAGTCATAAACT  
 GCC 3'
3. Праймери за синтезиране на версия "С"  
 F19Lc-сенс (34-мер):  
 5' CCCAAACTCCTCATCTATTGGGCTA  
 GCACTAGGG 3'
- F19Lc-антисенс (34-мер):  
 5' CCCTAGTGCTAGCCCAATAGATGAG  
 GAGTTTGGG 3'
4. Праймери хибридиращи към граниче-  
 щите PUC19 векторни последователности
- APCR1 (17 мер, сенс праймер):  
 5' TACGCAAACCGCCTCTC 3'
- APCR4 (18 мер, антисенс праймер):  
 5' GAGTGCACCATATGCGGT 3'
- RSP (-24) (16 мер, сенс праймер):  
 5' AACAGCTATGACCATG 3'
- UP (-40) (17 мер, антисенс праймер):  
 5' GTTTTCCAGTCACGAC 3'
- Пример 4. Конструирани на реконстру-  
 ирани човешки F19 тежки вериги версии А до Е  
 ( $H_A$ - $H_E$ )
- Версия "А" на реконструирани човешки  
 F19  $V_H$  област и ( $H_A$ ) се конструират при изпол-  
 зване на същите PCR методи, като описаните за  
 конструирането на версия "А" на реконструира-  
 на човешка F19  $V_L$  област ( $L_A$ ) (фигура 31). ДНК  
 (матрицата е версия "А" на реконструирана  
 човешка 226  $V_H$  (Leger O. J. P., Yednock T. A.,  
 Tanner L, Horner H. C, Hines E). K., Keen S,  
 Saldanha J., Jones T., Fritz L G. and Bending M. M.  
 (1997). Humanization of mouse antibody against  
 human alpha-4: potential therapeutic for the treatment  
 of multiple sclerosis. Hum. Antibod. 8: 3).  
 Проектират се и се синтезират шест PCR прай-  
 мера за конструирането на версия "А" на рекон-  
 струирана човешка F19  $V_H$  област (таблица 4).  
 PCR продуктите А, В, С и D се получават при  
 използване на APCR1-vha1, vha2-vha3, vha4-vha5,  
 vha6-APCR4 като PCR двойки праймери,  
 съответно. Условието на PCR са по същество ка-  
 то описаните за конструирането на реконстру-  
 ирана човешка F19  $V_L$  област. Клон, притежаващ

правилна ДНК последователност се означава с  
 reshF19Ha (фигура 32), след което се субкло-  
 нира в еукариотен експресионен вектор  
 pG1D105. ДНК последователността на  
 reshF19Ha, клонирана в pG1D105 е показана на  
 фигура 33.

Третата версия на реконструирана чо-  
 вешка F19  $V_H$  област ( $H_C$ ) се конструира при из-  
 ползване на същата схема, като описаната за  $H_A$ ,  
 но при която праймер Vha4 се замества с Vhc4  
 (таблица 4). ДНК последователността на  $H_C$  е  
 показана на фигура 32. Втората ( $H_B$ ) и четвър-  
 тата ( $H_D$ ) версии на реконструирана човешка F19  
 $V_H$  област се конструират на основата на мето-  
 ди на PCR-мутагенез на Kamman et al. (Kamman  
 M., Laufs J., Schell J. and Gronenborn B. (1989)  
 Rapid insertional mutagenesis of DMA by  
 polymerase chain reaction (PCR), Nucl. Acids  
 Res. 17:5404). За  $H_B$  и  $H_D$  се използва мутаге-  
 нен праймер F19VHbd6 (Tyr-91 до Phe-91, таб-  
 лица 4), сдвоени с APCR4 при PCR реакции е  
 $H_A$  и  $H_C$  като матрична ДНК, съответно. PCR  
 продуктите VHb и VHd се смилат е рестрикции-  
 онни ензими с PstI и BamHI и се субклонират в  
 reshF19Ha и reshF19Hc, съответно, предвари-  
 телно смлени със същите два рестриktionни  
 ензима. ДНК последователностите на  $H_B$  и  $H_D$   
 са показани на фигура 32.

Версия "Е" на реконструирана човешка  
 F19  $V_C$  област ( $H_E$ ) се конструира на основата  
 на мутагенезния метод на Kamman et al., (1989)  
 вече посочен по-горе:

За reshF19He мутагенен праймер  
 F19MscIHe (таблица 5) се използва сдвоен с  
 праймера F19V $_H$  HindIII (таблица 5) при PCR  
 реакции с He клониран в pg1d105 експресионен  
 вектор за бозайници, като ДНК матрицата.  
 Подходящите праймерни двойки (0,2 microM от  
 всяка) се комбинират с 10 ng сДНК от версия  
 "А" на реконструирана човешка 226  $V_H$  област  
 в 100 microl PCR буфер, съдържащ 10 mM  
 $(NH_4)_2SO_4$ , 20 microM Tris-HCl (pH 8,8) 2 mM  
 $MgSO_4$  0,1% Triton X-100 и 200 microM dNTPs.  
 Реакционните смеси се покриват с минерално  
 масло и се поддържат при 94°C за 5 min. Приба-  
 вят се десет 1 единици Deep Vent ДНК полиме-  
 раза (New England Biolabs) ("Hot Start" PCR;  
 Chou Q., Russell M., Birch D., Raymond J. and  
 Bloch W. (1992) Prevention of pre-PCR  
 mispriming and primer dimerization improves

low-copy-number amplifications. Nucl. Acids Res. 20:1717) и се провежда PCR за 25 цикъла върху TRIO-Thermoblock Thermal Cycler (Biotetra, Gottingen, Germany). Всеки цикъл се състои от етап на денатуриране при 94°C за 1 min, етап на хибридиране на праймера при 70°C за 1 min, и етап на удължаване при 72°C за 2 min. Следва единичен цикъл, състоящ се от етап на допълнително удължаване при 72°C за 10 min, следвано от охлаждане до 4°C. PCR продуктите се екстрахират след това и се пречистват от TAE 1,4% стандартен агарозен гел, при използване на QIAquick™ комплект за екстракция от гела, съгласно протокола доставен от производителя (Quiagen Ltd., UK). PCR продукта V<sub>II</sub> след това се смилва с рестрикционни ензими с MscI и HindIII и се лигира в reshF19He, клонира се в pg1d105, предварително смлян със същите рестрикционни ензими. MscI рестрикционният сайт за разпознаване е единствен за всички версии на реконструирани човешки F19 V<sub>II</sub> области и не присъства в pg1d105 за клониране V<sub>II</sub> гени на имуноглобулин. Компетентни чрез електропоруция XL-1 Blue E. coli клетки се трансформират с 1 microl от лигираната ДНК и се посяват върху агарозни блюда, съдържащи ампицилин. След това колонии се скринират за присъствието и правилните размери на инсертите чрез директен PCR върху колонии (Gussow D' and Clackson T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. Nucl. Acids Res. 17:4000) с праймери HCMi и Nucy1, хибридиращи към граничната pg1d105 векторна последователност (таблица 5). ДНК от положителни колонии се приготвя при използване на Plasmid Midi kit, съгласно протокола доставен от производителя (Quiagen Ltd., UK). ДНК секвенирането се провежда по метода на дидезокси завършването на веригата (Sanger F., Niclein S. and Coulson A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A. 74:5463) directly from circular vector DNA using conventional heat denaturation (Andersen A., Pettersson A. and Kieldsen T. (1992) A fast and simple technique for sequencing plasmid DNA with sequenase using heat denaturation, Biotechniques 13:678) and Sequenase 2.0 (USB, Cleveland, OH). ДНК последователността на reshF19He е показана на фигура 32.

Таблица 4. PCR праймери, за конструиране на реконструирана човешка F19 вариабилна област на тежки вериги версии A и D.

1. Праймери за синтезиране на версия "А" F19Vha1 (47 мер):  
5'TGTATTCAGTGAAGGTGTATCTACTAGT  
TTTACAGCTGACTT TCAC 3'
- F19Vha2 (53 мер):  
5'TAGTAGATACACCTTCACTGAATACA  
10 CCATACACTGGGTTAGACA GGCCCTG 3'
- F19Vha3 (71 мер):  
5' CCCTTGAACCTTCTGGTTGTAGTTA  
GGAATACCATTGTTAGGATTAATACCTCC  
TATCCACTCCAGCCTTTG 3'
- 15 F19Vha4 (71 мер):  
5' TAACTACAACCAGAAGTTCAAG  
GGCCGGGCCACCTTGACCGTAGGCAAGT  
CTGCCAGCACCGCTACATGG 3'
- F19Vha5 (63 мер):  
20 5'GCATGGCCCTCGTCGTAACCATAG  
GCGATTCTTCTTCTGGCGCAGTAGTAGA  
CTGCAGTGTCC 3'
- F19Vha6 (48 мер):  
5'CTATGGTTACGACGAGGGCCATGCT  
25 ATGGACTACTGGGGTCAAG GAAC 3'
2. Праймери за синтезиране на версия "С"  
F19Vhc4 (71 мер):  
5'TAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGG  
30 GTCACCATCACCGTAGACACCTCTGCCA  
GCACCGCCTACATGG 3'
3. Праймери за синтезиране на версия "В" и "D"  
F19vhbd6 (27 мер):  
35 5' GGACACTGCAGTCTACTTCTGC  
GCCAG 3'
4. Праймери хибридиращи към граничните PUC19 векторни последователности  
APCR1 (17 мер, сенс праймер):  
40 5' TACGCAAACCGCCTCTC 3'  
APCR4 (18 мер, антисенс праймер):  
5' GAGTGCAACATATGCGGT 3'
- Таблица 5. PCR праймер за конструиране на реконструирана човешка F19 вариабилна област на тежки вериги версии E
1. Праймер за синтезиране на версия "Е" F19MscIHe (65 мер, антисенс):  
5'CCCTTTGGCCAGGGGCTGTCTAACCC  
45 AGTGTATGGTGTATTC MscI  
50 AGTGAAGGTGTATCCACTAGTTTCCA

СТАGTTT 3'

2. Праймери хибридиращи към граничните pg1d105 векторни последователности за експресия в бозайници

HCMi (28 мер, сенс):

5' GTCACCGTCCTTGACACGCGTCTC

GGGA 3'

Hcyu1 (17 мер, антисенс):

5' TTGGAGGAGGGTGCCAG 3'

Пример 5. Концентрация на реконструирано човешко F19 антитяло в супернатантата на COS клетки

COS клетки се трансфектират с една двойка от серия структури на реконструирано човешко F19 антитяло и се измерва концентрацията на човешкото антитяло при използване на IgG1/капа ELISA, както е описано в пример 2.

Таблица 6. Концентрации на реконструирано човешко F19 антитяло в супернатанта на COS клетки

Компоненти	на трансфектирани антитета	Човешки у 1/К
Тежка верига	Капа лека верига	[в mg/ml]
H <sub>A</sub>	LA	2,50
H <sub>A</sub>	LB	0,18
H <sub>B</sub>	LA	1,25
H <sub>B</sub>	LB	0,10
H <sub>D</sub>	LA	1,15
H <sub>D</sub>	LB	0,18
H <sub>A</sub>	LA	1,50
H <sub>A</sub>	Lc	1,56
H <sub>c</sub>	LA	1,47
H <sub>c</sub>	Lc	1,97
cF19	LA	1,54
cF19	LB	0,07
cF19	Lc	2,14

Таблица 7. Концентрации на реконструирано човешко F19 антитяло в супернатанта на COS клетки

Компоненти	на трансфектирани антитета	Човешки у 1/К
Тежка верига	Капа лека верига	[в mg/ml]
H <sub>A</sub>	LA	2,00
H <sub>A</sub>	Lc	2,50
H <sub>c</sub>	LA	2,90
H <sub>c</sub>	Lc	3,00
H <sub>E</sub>	LA	2,80
H <sub>E</sub>	Lc	3,50

Събитие на РНК снаждане, необходимо за експресията на гените на имуноглобулина в клетки на бозайници

И двата вектора за експресия в бозайници рKN100 и pg1d105 притежават един интрон между вариабилната и константните области, който се отстранява по време на процеса на ген на експресия, за да се позволи получаването на информационна РНК. Събитието на снаждане, което се състои в ДНК рекомбинация между тежката или леката верига на горните сайтове за снаждане и имуноглобулиновия акцепторен сайт за снаждане се описва на фигура 34.

Пример 6. Поточенцитометричен анализ на свързването на сF19 и LАНс към човешки клетки, експресиращи FAP

Тества се способността на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> да се свързват към рекомбинантен и ендогенно експресиран FAP върху клетъчната повърхност.

Примерите се провеждат, за да се определи свързването на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> към клетъчния FAP. И двете, естествени MFSH човешки туморни клетки експресиращи FAP (Shirasuma, K. et al., Cancer 1985, 55:2521-32) и трансфектирана с FAP човешка туморна клетъчна линия се използват като клетъчни мишени. L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> се изучава при цитофлуориметрични изследвания, за да се определи директното свързване с клетките мишени, така както и чрез инхибиращия ефект върху свързването, било то на миши F19 или на химерни сF19 анти-FAP антители.

Използваните антители и клетъчни линии са F19 (мише моноклонално античовешко FAP анти тяло, IgG1 подклас), mIgG ("миши имуноглобулин, IgG клас), сF19 (химерно моноклонално античовешко FAP анти тяло, IgG1 подклас), L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> (реконструирано моноклонално античовешко FAP анти тяло, IgG1 подклас), hIgG1 1 човешки имуноглобулин, IgG1 подклас), MF-SH (човешка злокачествена фиброзна хистоцитомна клетъчна линия), HT-1080 (човешка фибросаркомна клетъчна линия), HT-1080FAP клон 33 (HT-1080 клетъчна линия трансфектирана с сДНК кодираща човешки FAP). Антителата се биотинират, както е описано в пример 8 и 12.

Директно свързване на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> към FAP на повърхността на човешка туморна клетъчна линия

5x10<sup>5</sup> клетки от туморна клетъчна линия, която се изследва, се инкубират с посочената

концентрация на тестово или контролно анти тяло при общ обем от 0,2 ml физиологичен разтвор буфериран с фосфат (PBS) с добавка на 1% говежди серумен албумин (BSA) за 30 min върху лед. Последващо клетките се промиват двукратно с 2 ml PBS, ресуспендират се 0,2 ml PBS с добавка на 1% BSA, 1:20 разреждане на миши античовешки IgG белязан с FITC (Dianova) се добавя като втори реагент) и се инкубират за още 30 min върху лед.

Алтернативно, 5 x 10<sup>5</sup> клетки от туморна клетъчна линия, която се изследва, се инкубират с посочената концентрация на белязан с биотин сF19 при общ обем от 0,2 ml PBS за 30 min върху лед. Последващо, клетките се промиват двукратно с 2 ml PBS, ресуспендират се 0,2 ml PBS с добавка на 1% BSA и се инкубират за още 30 min върху лед с 1:40 разреждане на стрептавидин-FITC (Dianova) като втори реагент.

Клетките отново се промиват двукратно с 2 ml PBS, ресуспендират се в общ обем от 0,5 ml PBS с добавка на 1% параформалдехид (PFA) и се държат върху лед. Определя се цитофлуориметрично единичната клетъчна флуоресценция чрез анализиране на клетъчната зелена флуоресценция при 488 nm в EPICS XL (Coulter) флуоресцентно активиран клетъчен анализатор.

Съревнование на LHC за свързване на биотиниран сF19 към клетъчната повърхност на клетъчна линия експресираща FAP.

5x10<sup>5</sup> клетки от туморна клетъчна линия, която се изследва, се инкубират с посоченото количество на небелязано тестово или контролно анти тяло добавено заедно с 1 microg/ml белязано с биотин сF19 анти тяло. Последователно, клетките се промиват двукратно с 2 ml PBS, ресуспендират се в 0,2 ml PBS с добавка на 1% BSA, 1:40 разреден стрептавидин-FITC (Dianova) като втори реагент и се инкубират за още 30 min върху лед.

Клетките след това се промиват двукратно с 2 ml PBS, ресуспендират се в общ обем от 0,5 ml PBS с добавка на 1% PFA като се държат върху лед. Определя се единичната клетъчна флуоресценция цитофлуориметрично чрез анализиране на клетъчната зелена флуоресценция при 488 nm на EPICS XL (Coulter) флуоресцентно активиран клетъчен анализатор.

И двете сF19 и L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> се свързват по начин, зависещ от концентрацията специфично на FAP-

трансфектирани HT-1080FAP клон 33 човешки туморни клетки (таблица 8). Не се установява свързване към FAP-негативни HT-1080 клетки (таблица 9). И двете cF19 и  $L_A H_C$  се свързват по начин, зависещ от концентрацията на човешки MF-SH клетки ендogenous експресиращи FAP (таблица 10).

Биотиниран cF19 се свързва към човешки HT-1080FAP клон 33 (таблица 11) по начин зависещ от концентрацията. Не се открива свързване към FAP-негативни HT 1080 клетки (таблица 12).

Свързването на биотинирани cF19 към IT-1080FAP клон 33 клетки се инхибира както от небелязан cF19, така и от небелязан  $L_A H_C$  (таблица 13).

Показано е за химерно античовешко FAP моноклонално антитяло cF19, така както и за ре-

конструирано човешко античовешко FAP моноклонално антитяло  $L_A H_C$  (пример 10), че се свързва директно към FAP експресиран върху човешки клетъчни линии, ендogenous експресиращи този протеин или трансфектирани с ДНК кодираща този протеин. За това свързване е показано, че зависи от концентрацията. Свързването на биотиниран cF19 може да бъде инхибирано от небелязан cF19, както и от небелязан  $L_A H_C$ .

При използване на цитофлуорометрични техники, директното свързване, както и инхибирането на специфично свързващите реагенти показва специфичност на химерното cF19 и реконструирани  $L_A H_C$  човешки моноклонални антитела към FAP експресиран върху клетъчната повърхност.

Таблица 8. Свързване на анти-FAP антитела към HT-1080FAP клон 33 клетки

Концентрация на антитела [ng/ml]	Среден интензитет на флуоресценция		
	hlgG1	cF19	$L_A H_C$
500,0	0,12	6,65	2,76
100,0	0,12	1,68	0,66
20,0	0,12	0,43	0,22
4,0	0,12	0,17	0,15
0,8	0,12	0,14	0,13

Таблица 9. Свързване на анти-FAP антитела към нетрансфектирани HT-1080FAP клетки

Концентрация на антитела [ng/ml]	Среден интензитет на флуоресценция		
	hlgG1	cF19	$L_A H_C$
500,0	0,11	0,11	0,12
100,0	0,11	0,11	0,11
20,0	0,11	0,11	0,12
4,0	0,11	0,11	0,12
0,8	0,11	0,11	0,11

Таблица 10. Свързване на анти-FAP антитела към MF-SH клетки

Концентрация на антитела [ng/ml]	Среден интензитет на флуоресценция		
	hlgG1	cF19	LAHc
4000	0,6	3,6	2,8
2000	n.d.	3,3	2,5
1000	n.d.	2,4	1,9
500	n.d.	1,8	1,3

n.d.: не е проведен

Таблица 11. Свързване на биотинирано cF19 антитяло към HT-1080FAP клон 33 клетки

Концентрация на антитела [ng/ml]	Среден интензитет на флуоресценция	
	Биотиниран hlgG1	Биотиниран cF19
5 000,0	0,2	36,5
1 000,0	0,2	18,1
200,0	0,2	4,5
40,0	0,2	1,3
8,0	0,2	0,5
1,6	0,3	0,3

Таблица 12. Свързване на биотинирано cF19 антитяло към нетрансфектирани HT-1080 клетки

Концентрация на антитела [ng/ml]	Среден интензитет на флуоресценция	
	Биотиниран hlgG1	Биотиниран cF19
5 000,0	0,1	0,1
1 000,0	0,1	0,1
200,0	0,1	0,1
40,0	0,1	0,1
8,0	0,1	0,1
1,6	0,1	0,1

Таблица 13. Съревявание на анти-FAP антитела със свързването на биотиниран cF19 към HT-1080FAP клон 33 клетки

	Концентрация на конкуритивно антитяло	Средна концентрация на флуоресценция
Конкуритивно антитяло	[µg/ml]	
No	0,00	11,2
hIgG1	1,00	9,0
hIgG1	3,16	11,3
hIgG1	10,00	9,8
hIgG1	31,66	10,3
cF19	1,00	7,5
cF19	3,16	4,8
cF19	10,00	1,3
cF19	31,66	1,2
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	1,00	8,0
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	3,16	5,5
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	10,00	2,9
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	31,66	1,7

Биотиниран cF19 се използва при концентрация от 1 µg/ml при всички тестове, показани в таблица 13.

Пример 7. *In vitro* имунни ефекторни функции на моноклонално антитяло L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Този експеримент се провежда, за да се определи силата на моноклоналното антитяло (mAb) L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> със специфичност към антиген за активиране на фибробласти (FAP) за лизиране на FAP експресиращите мишени в присъствие на човешки комплемент или човешки моноядрени левкоцити, съответно.

По-специално се изследва способността на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> да медира цитотоксични ефекти срещу HT-1080FAP клон 33 клетки, които експресират човешки FAP на повърхността. Цитотоксичността се определя *in vitro*, при използване на следния подход: <sup>51</sup>Cr-маркирани клетки мишени се инкубират в присъствие на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с човешки серум като източник на комплемент или човеш-

ки MNC (моноядрени клетки от периферна кръв) като ефектори. Измерва се освобождаването на <sup>51</sup>Cr, като мярка за лизис на клетките мишени.

Използваните антитела и клетъчните линии са L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> (реконструирано човешко античовешко FAP IgG1 антитяло), hIgG1 (човешки IgG1 изотип контрола), 3S193 (мише моноклонално anti-H-Lewis<sup>y</sup> IgG1 антитяло), mIgG (мише IgG1 контрола), HT-1080 (човешка фибросаркома), HT-1080FAP клон 33, (HT-1080 трансфектирани със cДНК кодираща човешки FAP), MCF-7 (човешка ендоканциномна клетъчна линия от гърда).

Лизис на клетки мишени, медиран от L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Туморни клетки се бележат с радиоактивен изотоп чрез инкубиране в RPMI 1640 среда със 100 µCi <sup>51</sup>Cr (NEN) при 37°C за 1 h. След това клетките се промиват двукратно в среда без <sup>51</sup>Cr и се ресуспендират при концентрации от 2 x 10<sup>5</sup> клетки на ml.



Приготвя се свеж човешки серум като източник на комплемент от кръв на различни доброволци. Кръвта се взима като се пробжда вената на ръката, оставя се на стайна температура за 1 h, за да се даде възможност да се образува съсирване и се съхранява при 4°C през нощта. Серумът се разделя чрез центрофугиране и се извлича от седимента.

Изучаваното антитяло се разрежда от изходния разтвор до подходящата концентрация в RPMI 1640 среда за клетъчно култивиране.

1 x 10<sup>5</sup> белязани с радиоактивен изотоп туморни клетки от посочената клетъчна линия се инкубират 2 h при 37°C в инкубатор (95% въздух и 5% CO<sub>2</sub>) в присъствие на различни концентрации на тестваното или контролното антитя-

ло и 25% (об/об) човешки серум като източник на човешки комплемент. Инкубирането протича в U-образни 96-ямкови блюда при общ обем от 200 µl RPMI 1640 и се прави в три повторения. След инкубационния период блюдата се центрофугират, 100 µl супернатанта се отстраняват и се преброява радиоактивността в Гама брояч. Общото количество инкорпорирана радиоактивност се определя чрез измерване на 10<sup>4</sup> клетки мишени. Определя се спонтанното отделяне от клетките мишени при отсъствие и на двете -антитяло и комплемент, по време на описания инкубационен период,

15 Специфичният лизис се изчислява както следва:

$$\text{специфичен лизис (в \%)} = \frac{[\text{активност на пробата}] - [\text{активност на спонтанно отделяне}]}{[\text{максимална активност}] - [\text{активност на спонтанно отделяне}]} \times 100$$

Антитяло зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC) на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Туморни клетки се бележат с радиоактивен изотоп чрез инкубиране в RPMI 1640 среда със 100 µCi <sup>51</sup>Cr (NEN) при 37°C за 1 h. 25 Последващо, клетките се промиват двукратно в среда без <sup>51</sup>Cr и се ресуспендира при концентрация от 2 x 10<sup>5</sup> клетки на ml.

MNC (едноядрени клетки от периферна кръв) се приготвят от периферна кръв взета чрез пробиване на вената на ръката на здрави доброволци хора. Съсирването се предотвратява чрез добавяне на 20% цитратен буфер. MNC от 4 ml от този кръвен препарат се пречиства чрез центрофугиране 130 min при 400 g и при стайна температура) върху 3 ml среда за изготвяне на лимфоцитни препарати (Boehringer Mannheim, Germany). MNC (едноядрени клетки от периферна кръв) се изваждат от градиента, промиват се три пъти и се разреждат с RPMI 1640 до подходящата концентрация, Лимфоцитни активирани килърни (LAK) клетки се изваждат от MNC (едноядрени клетки от периферна кръв) чрез инкубиране в продължение на 5 дни при 37°C в инкубатор с 95% въздух и 5% CO<sub>2</sub>, при изходна плътност от 1,3 x 10<sup>6</sup> клетки на ml в присъствие на

100 U рекомбинантен човешки интерлевкин-2 (IL-2). Изучаваното антитяло се разрежда от стоковия разтвор до подходяща концентрация в RPMI 1640 среда за клетъчно култивиране.

1 x 10<sup>4</sup> туморни клетки, белязани с радиоактивен изотоп от посочената клетъчна линия се инкубират в продължение на 5 h при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в присъствие на различни концентрации на тествано или контролно антитяло и MNC. MNC се прибавят в количества да достигнат посоченото съотношение ефектор:мишена. Инкубирането протича в U-образни 96-ямкови блюда при общ обем от 200 µl RPMI 1640 и се правят в повторения.

35 След периода на инкубиране блюдата се центрофугират, отделят се 100 µl от супернатанта и се определя радиоактивността в Гама-брояч. Общото количество инкорпорирана радиоактивност се определя чрез измерване на 10<sup>4</sup> клетки мишени. Определя се спонтанното отделяне като активност на освобождаване от клетките мишени при отсъствие и на двете - антитяло и ефекторни клетки, по време на описания инкубационен период, по-горе.

45 Специфичният лизис се изчислява както следва:

$$\frac{\text{специфичен лизис (в \%)} \cdot [\text{активност на пробата}] - [\text{активност на спонтанно отделяне}]}{[\text{максимална активност}] - [\text{активност на спонтанно отделяне}]}$$

Антитяло-медиран комплементен лизис на туморни клетки

Не се наблюдава  $L_A H_C$  - специфичен комплемент-медиран лизис (по-горе наблюдавано с изотипна контрола) в HT-1080FAP клон 33 клетки, третирани с  $L_A H_C$  при концентрации до 50  $\mu\text{g/ml}$  (таблица 14, таблица 15a).

Литичната активност на човешкия серум, използван като източник на комплемент е показана чрез лизис на MCF-7 клетки от човешка карцинома на гърдата в присъствие на 12,5  $\mu\text{g/ml}$  3S193, мише моноклонално анти Lewis<sup>y</sup> антитяло с известна способност за активиране на комплемента (таблица 15b).

Антитяло-медиран клетъчен лизис на туморни клетки

В присъствие на  $L_A H_C$  при концентрации до 10  $\mu\text{g/ml}$  не се открива ADCC (антитяло-зависима клетъчна токсичност) медирана от човешки MNC (таблица 16) или LAK клетки (лимфокин-активирани килърни клетки, таблица 17) на  $L_A H_C$  върху HT-1080FAP клон 33, както е измерено чрез лизис, преди това което е показано с изотип контрола при съотношение на ефектор:мишена 50:1.

При подходящо *in vitro* изследване или с човешки комплемент или с човешки MNC-като ефекторни механизми, човешки анти-FAP моноклонално антитяло  $L_A H_C$  разкрива неоткриваеми цитотоксични ефекти преди изотип контролите върху FAP-експресираща туморна клетъчна линия HT-1080FAP клон 33.

Таблица 14. Специфичен комплемент лизис (в %) на HT-1080FAP клон 33 туморни клетки мишени, медиран от  $L_A H_C$

Източник на човешки серум	HT-1080клон33:	
Концентрация на антитяло	hlgG1 изотип контрола	$L_A H_C$
A 50 $\mu\text{g/ml}$	5	4
A 10 $\mu\text{g/ml}$	5	3
B 50 $\mu\text{g/ml}$	7	5
B 10 $\mu\text{g/ml}$	6	5
0 $\mu\text{g/ml}$	0	0

Инкубиране: 2 h при 37°C, 25% серум от хора доброволци А или В, съответно, като източник на комплемент.

Таблица 15а. Специфичен комплемент лизис (в %) на HT-1080FAP клон 33 туморни клетки мишени медиран от човешки анти-FAP моноклонално антитяло L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Източник на човешки серум	HT-1080 клон 33:	
Концентрация на антитяло	hIgG1	LAHC
A 10,00 µg/ml	2	1
A 2,50 µg/ml	2	2
A 0,60 µg/ml	1	1
A 0,15 µg/ml	1	2
A 0,00 µg/ml	2	2
B 10,00 µg/ml	2	2
B 2,50 µg/ml	2	2
B 0,60 µg/ml	2	2
B 0,15 µg/ml	2	2
B 0,00 µg/ml	2	2
C 10,00 µg/ml	2	2
C 10,00 µg/ml	1	1
C 10,00 µg/ml	1	1
C 10,00 µg/ml	2	1
C 10,00 µg/ml	3	3

Инкубиране: 2 h при 37°C, 25% серум от хора доброволци А, В или С, съответно, като източник на комплемент.

Таблица 15b: Специфичен комплемент лизис (в %) на MCF-7 туморни клетки мишени медиран от миши анти Lewis<sup>y</sup> моноклонални антитела 3S193

Източник на човешки серум	MCF-7	
	mlg G	3S193
Концентрация на антитяло А	0	21
10,00 µg/ml		
A 2,50 µg/ml	1	21
A 0,60 µg/ml	0	21
A 0,15 µg/ml	1	18
A 0,00 µg/ml	0	0
B 10,00 µg/ml	1	13
B 2,50 µg/ml	0	17
B 0,60 µg/ml	1	18
B 0,15 µg/ml	1	15
B 0,00 µg/ml	0	0
C 10,00 µg/ml	1	22
C 10,00 µg/ml	0	23
C 10,00 µg/ml	1	26
C 10,00 µg/ml	1	20
C 10,00 µg/ml	1	1

Инкубиране: 2 h при 37°C, 25% серум от хора доброволци А, В или С, съответно, като източник на комплемент.

Таблица 16. ADCC (антитяло-зависима клетъчна токсичност) (специфичен лизис в %) на HT-1080FAP клон 33 клетки мишени от човешки MNC (едноядрени клетки от периферна кръв) медиран от L<sub>A</sub>H<sub>c</sub>

HT-1080FAP клон 33:

Концентрация на антитяло	HT-1080FAP клон 33:	
	htgG1	L <sub>A</sub> H <sub>c</sub>
[ в µg/ml ]		
10,000	2	2
2,500	2	2
0,625	2	2
0,125	3	3
0,000	3	3

Инкубиране: 5 h при 37°C, 10<sup>4</sup> клетки мишени и клетъчно съотношение ефектор:мишена от 50:1.

Таблица 17. ADCC (антитяло-зависима клетъчна токсичност, специфичен лизис и %) на HT-1080FAP клон 33 клетки мишени от LAK клетки (лимфокин активирани килърни клетки) медиран от  $L_A H_c$

Концентрация на антитяло [ в $\mu\text{g/ml}$ ]	HT-1080FAP клон33: hIgG1	$L_A H_c$
10,000	12	14
2,500	14	17
0,625	14	21
0,125	15	21
0,000	14	14

Инкубиране: 5 h при  $37^\circ\text{C}$ ,  $10^4$  клетки мишени и клетъчно съотношение ефектор:мишена от 50:1.

Пример 8. Имунохистохимичен анализ на моноклонално антитяло  $L_A H_c$  свързване към нормални и неопластични човешки тъкани

Този експеримент се провежда, за да се определят характеристиките на свързване на хуманизирано mAb  $L_A H_c$  към нормални и неопластични човешки тъкани.

Използват се следващите антитела:  $L_A H_c$ , cF19 и негативната контрола hIgG1, когато са директно биотинирани, съгласно методите от състоянието на техниката, и се използват при концентрации от 2,5 до 0,25 mg/ml в 20% BSA/PBS (говежди серумен албумин в буфериран с фосфат физиологичен разтвор). Използва се мише mAb F19 като супернатанта на тъканна култура на F19 хибридома, при разреждане от 1:5 до 1:10 в 2% BSA/PBS.

Използват се следните реагенти за имунохимични изследвания: стрептавидин пероксидазен комплекс (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), авидин-биотин пероксидазен комплекс (Vector Labs.), биотиниран конски антимиши (Vector Labs.), DAB (диаминобензидин, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), хематоксилин на Harris.

Разглежданите свежо замразени тъканни проби включват следното: дебело черво, гърда, бял дроб, стомах, панкреас, кожа, ларинкс, пикочен мехур, гладка и напречно-набраздена мускулатура. Сред тестваните тумори са карциноми от гърда, от дебело черво, от бял дроб, от хранопровод, от яйчници, от матка, от панкреас,

от стомах и глава и врат.

Индиректният имунопероксидазен метод се осъществява съгласно методите от състоянието на техниката (Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ: Cekk surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proc. Natl. Acad. Sci USA (1990) 87:7235-7239) върху прясно замразени срезове с дебелина от 5  $\mu\text{m}$ . Използва се DAB като субстрат за крайния реакционен продукт. Срезове се оцветяват за брояч с хематоксилин на Harris и се оглеждат за антигенна експресия.

$L_A H_c$  експресия в нормални човешки тъкани

Тестваните нормални тъкани са отрицателни за  $L_A H_c$  експресия, с изключение за нормален панкреас, при който се идентифицират подгрупа позитивни ендокринни клетки в Лангерхансовите островчета (A клетки) с  $L_A H_c$  cF19 и F19 (таблица 18). Не се наблюдава имунореактивност с hIgG (подклас човешки имуноглобулин hgG1), използван като отрицателна контрола.

$L_A H_c$  експресия в тумори

При туморни проби,  $L_A H_c$ , cF19 и F19 показват неотличим модел на експресия в туморни стромални фибробласти. Силна и хомогенна експресия се открива в по-голямата част от разглежданите случаи, по-специално в проби на рак на гърдата, дебелото черво, белите дробове, панкреаса и карцином на плоския епител (SQCC) на тестваните глава и врат (таблица 19). Не се наблюдава имунореактивност с hIgG1, който се използва като отрицателна контрола,

$L_A H_C$ , cF19 и F19 показват имунореактивност с туморните стромални фибробласти в тестваните проби на рак на епитела. Не се наблюдава имунореактивност на  $L_A H_C$  или F19 в фиброцити от мезанхим на нормален орган или от клетки на паренхима на нормални органи. Анти-FAP имунореактивност се наблюдава единствено в подгрупа ендокринни клетки в островчетата на

панкреаса, предполага се, че са А клетки, продуциращи глюкагон, и в четири от девет тествани маточни проби, което представлява подгрупа от стромални фибробласти в тези тъкани.

Имунохистохимичен анализ на  $L_A H_C$  в нормална човешка тъкан и FAP експресиращи човешки карциноми показват неразличими модели на свързване за  $L_A H_C$ , cF19 и миши mAb F19.

Таблица 18. Имунореактивност на mAbs  $L_A H_C$ , cF19 и F19 при нормални човешки тъкани

Тип тъкан	No.	ВВН 1	C19	F19
Гърди	4			
-Епителни клетки на канали/алвеоли		-	-	-
-Миоепителни клетки		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
-Кръвоносни съдове		-	-	-
Дебело черво	6			
-Чревни жлези на Либеркюн		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
-Лимфоидна тъкан		-	-	-
-Гладка мускулатура		-	-	-
-Кръвоносни съдове		-	-	-
-Миантеричен плексус	-	-	-	
Бял дроб	4			
Бронх:				
-Бронхиален епител		-	-	-
-Хиелинен хрущял		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
-Слизести жлези		-	-	-
Алвеоли:				
-Пневматични (тип I/II)		-	-	-
-Алвеоларни фагоцити		-	-	-
-Алвеоларни капиляри	-	-	-	
Стомах	3			
-Повърхностен епител		-	-	-
-Стомашни жлези:				
-Главни клетки		-	-	-
-Париетални (облицовъчни) клетки		-	-	-
-Слизести клетки	-	-	-	

-Невроендокринни клетки -Съединителна тъкан -Кръвоносни съдове -Гладка мускулатура		-	-	-
Хранопровод -Повърхностен епител -Съединителна тъкан	1	-	-	-
Тънки черва -Епител на вилите и триптите -Съединителна тъкан -Гладка мускулатура -Кръвоносни съдове -Линфоидна тъкан	1	-	-	-
-Пикочен мехур -Уротелиум -Съединителна тъкан -Гладка мускулатура -Кръвоносни съдове	2	-	-	-
Панкреас -Епител на каналите -Ацинарен епител -Островчета на Лангерханс: -В-клетки -А-клетки -Д-клетки -Съединителна тъкан -Кръвоносни съдове -Нерви	3	- - - - +* - - - - -	- - - - +* - - - - -	- - - - +* - - - - -

Ларинкс	1			
-Плосък епител		-	-	-
-Слизести жлези		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
-Хиалинен хрущял		-	-	-
-Кръвоносни съдове		-	-	-
-Скелетна мускулатура		-	-	-
Лимфен възел	1			
-Лимфни клетки		-	-	-
-Лимфни синуси		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
-Кръвоносни съдове		-	-	-
Далак	1			
-Червена и бяла пулпа		-	-	-
-Синуси		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
Черен дроб	1			
-Хепатоцити		-	-	-
-Канали на жлъчката		-	-	-
-Портална триада		-	-	-
Тироидна жлеза	2			
-Фоликулярен епител		-	-	-
-Парафуликулярни клетки		-	-	-
-Съединителна тъкан		-	-	-
Простата жлеза	1			
-Жлезист епител		-	-	-
-Строма		-	-	-
Тестиси	1			
-Семепроводи		-	-	-
-Строма		-	-	-



Яйчници -Фоликули -Строма	3	-	-	-
Шийка на матката -Епител -Строма	1	-	-	-
Матката -Ендуметриум (лигавица на матката) - жлези - строма - кръвоносни съдове -Миометриум (мускулен слой на стената)	9	- - +# - -	- - +# - -	- - +# - -
Мозъчна кора -Неврони -Клетки на невроглията -Кръвоносни съдове	1	- - -	- - -	- - -
Малък мозък -Молекулярен слой -Грануларен клетъчен слой -Клетки на Пуркиние -Кръвоносни съдове	1	- - - -	- - - -	- - - -
Кожа -Плосък епител -Меланоцити -Кожни апендици -Съединителна тъкан -Кръвоносни съдове	3	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Фиксирани с ацетон замразени срезове се тестват чрез авидин-биотинов комплекс имунопероксидазна процедура.

Но, брой тъканни проби от различни тествани индивиди

\* Идентифициране на А-клетки на основата на морфологията и разположението в островчетата.

# Положителна имунореактивност на стромата при четири от девет тествани проби. Положителните проби представляват ранна (x2) или междинна (x2) фаза на пролифериращ ендометриум.

Пример 9. Видова специфичност" на  $L_A H_C$  свързването в тъканни срезове

Тези експерименти се провеждат, за да се изследва реактивността на  $L_A H_C$  тъкани от мишка, плъх, заек и *супотолгус маймуни*, чрез имунохистохимични методи.

При тези тестове се използват също така F19 и IgG1 (hIgG1) като негативни контроли. Използваните реагенти за имунохистохимията са стрептавидин пероксидазен комплекс (Vector Labs., Burlingame, CA, USA), DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, IVtO, USA) и хематоксилин на Harris.

Тестват се следните прясно замразени тъканни проби от мишка, плъх, заек и *супотолгус маймуни*: мозък, черен дроб, бъбреци, стомах, панкреас, черва, тимус, кожа, мускули, сърце, далак, яйчник, матка и тестиси. Във всяко изследване се включват срезове с проби на норма-

лен човешки панкреас и карцином на гърдата като положителни контроли.

#### Имунохистохимия

- Провежда се един индиректен имунопероксидазен метод, както е описано в състоянието на техниката (Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig VVJ: Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proc. Natl. Acad. Sci USA (1990) 87:7235-7239) върху прясно замразени срезове с дебелина 5 microm. Антителата  $L_A H_C$ , cF19 и hIgG1 (1 microg/ml) се биотинират, съгласно състоянието на техниката и се определят чрез стрептавидин пероксидазен комплекс. DAB се използва като субстрат за крайния реакционен продукт. Срезове се дооцветяват с хематоксилин на Harris и се разглеждат за антигенна експресия.

- Тестваните нормални тъкани не реагират с  $L_A H_C$  или F19 в експериментите (таблица 1).

- Нормалният човешки панкреас, използван като положителна контрола показва  $L_A H_C$  и cF19 свързване при подгрупа ендокринни клетки в Лангерхансовите островчета, както е описано по-горе за F19. Освен това, свързването на  $L_A H_C$  и cF19 се вижда в туморните стромални фибробласти при проба от карцином на гърда.

- Имунохистохимичният анализ на нормални тъкани от мишка, плъх, заек и *супотолгус маймуни* не открива каквото и да е свързване нито на  $L_A H_C$  нито на cF19, при направените изследвания.

Таблица 20. Свързване на  $L_A H_C$  към тъканни срезове от нечовешки видове, както се определя чрез имунохистохимия

Орган / Тип тъкан	Мишка	Плъх	Заек	<i>Synomolgus</i> маймуна
Мозък - Мозъчна кора	-	-	-	
-Малък мозък	-	-	-	-
Черен дроб - хепатоцити	-	-	-	-
-портална триада	-	-	-	-
Бял дроб - бронхи	-	-	-	-
- алвеоли	-	-	-	-
Бъбреци - гломерули	-	-	-	-
- тубуларен епител	-	-	-	-
Стомах- жлезен епител	-	-	-	-
-гладка мускулатура	-	-	-	-
Панкреас - екзокринни секретиращи алвеоли	-	-	-	-
- ендокринни островчета	-	-	-	-
Черва - жлезен епител	-	-	-	-
- гладка мускулатура	-	-	-	-
Тимус - лимфоцити	-	-	-	-
Кожа - кератиноцити	-	-	-	-
- потни жлези	-	-	-	-
- космени фоликули	-	-	-	-
Скелетна мускулатура	-	-	-	-
Сърце	-	-	-	-
Далак - лимфоцити	-	-	-	-
Яйчник -фоликулярен епител	-	-	-	-
- строма	-	-	-	-
Матка - миометриум	-	-	-	-
- маточна шийка	-	-	-	-
Тестиси -тубуларен епител	nt	nt	nt	-
Съединителна тъкан	-	-	-	-

nt, не е тестван

Пример 10. Конструирание на клетъчни линии, продуциращи химерни и реконструирани анти-FAP моноклонални антитела

Цел на настоящия експеримент е да демонстрира стабилни клетъчни линии, съгласно изобретението, експресиращи  $L_A H_C$ ,  $L_A H_A$ ,  $L_B H_B$ ,  $L_D H_D$  и F19 в CHO DG44 клетки. Продуцират се стабилни клетъчни линии, трансформирани с хуманизирани или химерни антитела и тяхната идентичност се потвърждава чрез PCR амплифициране на тежката и леката вариабилни области, при използване на ДНК, произлизаща от всеки трансфектант като матрица.

CHO DG44 клетки поддържани при безсерумни условия в SFM-II среда, Липофектин и безсерумна и SFM-II среда се получават от Gibco/BRL. Генетицин, както и всички рестрикционни ензими се получават от Boehringer Mannheim. Pfu полимераза се доставя от Stratagene.

ДНК за трансфектиране се пречиства от клетки на *E. coli*, при използване на QiaFilter Maxi Cartridges (Qiagen), както се препоръчва от производителя. Всички ДНК препарати се проучват чрез смилане с рестрикционни ензими. Последователностите на  $L_A H_C$  вариабилните области в съответните им вектори се потвърждават при използване на ABI PRISM 310 Sequencer (Perkin-Elmer).

Друга информация по отношение на използваните вектори и ДНК последователности се предоставя в предходните примери.

Трансфектиране на CHO DG44 клетки

Клетки в логаритмична фаза на развитие се посяват в 6-ямкови блода, съдържащи 1 ml свежа SFM-II среда, CHO DG44 клетките се ко-трансфектират с плазмиди, кодиращи тежки и леки вериги на хуманизирана или химерна версия, при използване на липозомална трансфекция. Липозомите се приготвят при използване на 6 ml реагент Липофектин и 0,5 g от всеки вектор (един за желаната тежка верига и един за желаната лека верига), както е описано за Lipofectamine трансфекциите, с изключение на това, че SFM-N средата се използва за разреждане на всички реагенти. 24 h по-късно клетките се разреждат 1:10 в SFM-II среда, съдържаща 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  генектин. След приключване на първоначалната фаза на убиване на клетките (10-14 дни) концентрирането на генектин

се намалява до 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  и се прибавя метотрексат до крайна концентрация от 5 nM. Концентрациите на метотрексат се увеличават след 10-14 дни до крайна концентрация от 20 nM.

5 PCR амплифициране на трансфектирана ДНК

10<sup>7</sup> CHO DG44 клетки се центрофугират в микроцентрофуга на Епендорф за кратко при пълна скорост, промиват се с PBS и се утаяват отново. Геномна ДНК се приготвя чрез утаяване с етанол след SDS лизис и третиране на клетъчната утайка с протеиназа К.

15 Смес, съдържаща едно от следните - двойки праймери, dNTPs, буфер и Pfu полимераза се използват за амплифициране на вариабилните области или на тежката верига или на леката верига, при използване на ДНК като матрица. Получените PCR продукти се смилат с подходящия рестрикционен ензим и се анализират чрез електрофореза върху агарозен гел, за да се потвърди тяхната идентичност.

Праймерна група на лека верига:

5'-GAG ACA TTG TGA CCC AAT CTC C  
- 3' PKN 1690

25 5'-GAC AGT CAT AAA CTG CCA CAT  
CTT C - 3' PKN 1930. R

Праймерна група на тежка верига:

5'-TTG ACA CGC GTC TCG GGA AGC TT  
- 3' PG 5863

30 5'-GGC GCA GAG GAT CCA CTC ACC T  
- 3' PG 6332. R

PCR продуктът на несмляната тежка верига е с предсказания размер от 469 bp, докато PCR продуктът на леката верига е с предсказан размер от 286 bp. Проверка на идентичност се определя чрез смилане с рестрикционни ензими с BstEII (тежка верига) или NlaIV (лека верига).

40 CHO клетъчни линии се трансфектират с експресиращи  $L_A H_C$ ,  $L_A H_A$ ,  $L_B H_B$ ,  $L_B H_D$ , както и с F19. Получават се клетки, устойчиви на генетицин и тези клетки се подлагат на по-нататъшна селекция за устойчивост на метотрексат. PCR амплифициране, следвано от разцепване с рестрикционни ензими на леката и тежката верига на ДНК води до получаване на очакваните ивици и потвърждава идентичността на трансфектантите, експресиращи  $L_A H_C$ ,  $L_A H_A$ ,  $L_B H_B$  и  $L_B H_D$ .

50 Описаните клетки се поддържат при без-

серумни условия през цялото време и не се обработват с продукти получени от животни, като трипсин.

Получават се продуциращи клетъчни линии трансфектирани с експресиращите моноклонални  $L_A H_C$ ,  $L_A H_A$ ,  $L_B H_B$  и  $L_B H_D$  и F19 антитела. Тяхната идентичност се потвърждава чрез PCR амплифициране и разцепване с рестрикционни ензими на получените PCR продукти и на двете техни леки и тежки вариабилни области.

Пример 11. Експресия на протеини на антитела в DG44 клетки от яйчник на китайски хамстер и тяхното пречистване

Цел на настоящия експеримент е да се експресират и пречистят  $L_A H_C$ ,  $L_A H_A$ ,  $L_B H_B$  и  $L_B H_D$  mAbs, което да позволи тяхното охарактеризиране. Други цели включват установяването на количествен ELISA, което да позволи концентрациите на антитела както в проби на свежа среда, така и в проби на пречистен Ig и да се определят относителните нива на експресия на различни хуманизираны F19 структури при използване на това изследване.

Безсерумни CHO DG44 клетки USP-grade метотрексат се получават от Biotechnical production Unit of the Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, Germany; и двата продукта са достъпни в търговската мрежа. Клетките се поддържат при безсерумни условия през цялото време. SFM-II безсерумна среда се получава от Gibco/BRL Protein A агароза е от Pierce Chemical (Indianapolis, IN, USA). Човешки IgG1 стандарти (Cat. No I 3889), р-нитрофенил фосфат таблетки (N 2640), говежди серумен албумин (BSA) (A 7906) и козя античовешка Капа верига специфична алкална фосфатаза-конюгирано антитяло (A 3813) се получават от Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Козя античовешка Капа верига специфична алкална фосфатаза-конюгирано антитяло се получава от Jackson Immunoresearch Laboratories (чрез Siralech Scientific). Буфериран с Tris физиологичен разтвор (TBS) се състои от 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5.

Условия на клетъчно култивиране за експресия на антитела

Клетките се култивират и поддържат в T-175 колби в SFM-II безсерумна среда без разклащане. Средата съдържа 200 microg/ml генетицин и 20 nM метотрексат без антибиотици. Клетките се пасират чрез разреждане, не са за-

лепнали и растат на малки групи. Когато клетките достигнат стационарна фаза средата се събира и се центрофугира, за да се отстранят клетките, след което се замразява при  $-20^{\circ}\text{C}$  до необходимост.

Пречистване на  $L_A H_C$

Всички етапи на пречистване се провеждат при  $4^{\circ}\text{C}$ . Колоната C10/10 (Pharmacia Fine Chemicals) се напълва с Protein A агароза (3 ml празен обем). Колоната се промива с TBS и предварително се елюира еднократно с 0,1 M Na цитрат, pH 3,0 за да се подсигури, че в колоната не е останал неправилно свързан материал. След това колоната веднага се преуравновесява с TBS и се съхранява при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатанти на изтощени култури се размразяват и се центрофугират при  $10\,000 \times g$  за 30 min преди Protein A хроматографа за отстраняване на отломките и се разреждат с равен обем TBS. Този материал се зарежда на Protein A колоната с 0,5 ml/min при използване на P-1 перисталтична помпа (Pharmacia) и се промиват с TBS, докато абсорбцията на 280 nm стане незначителна. Елюирането на антитялото се инициира с 0,1 M Na цитрат, pH 3,0 при 0,2 ml/min. Елюирането се наблюдава при 280 nm и фракции по 1 ml от елюирания материал се събират в епруветки, съдържащи достатъчно Tris основа pH 9, за да неутрализира цитратния буфер. Фракциите, съдържащи протеин се обединяват и се центрофугират при използване на Amicon апарат за филтриране с YM-30 филтър и се диализират срещу PBS. Колоната веднага се регенерира с TBS. Осъществяват се изследвания за свързване на протеина с багрило, с BioRad (Hercules, California) комплект за определяне на протеини, съгласно инструкциите на производителя, при използване на серумен албумин като стандарт.

ELISA на човешки IgG (Гама имуноглобулин)

ELISA блюда се покриват през цялата нощ със 100 microg козя античовешка Гама верига специфична алкална фосфатаза-конюгирано антитяло 0,4 mg/ml покривен буфер при  $4^{\circ}\text{C}$ . Покривното антитяло се отстранява и блюдата се блокират с 2% BSA в PBS за 2 h. Всички последващи етапи се извършват при  $37^{\circ}\text{C}$ . Блокиращият буфер се заменя с проби на антитяло или стандарт на човешки IgG1 разреден в буфер за разреждане, разрежда се серийно в обем от 200

ml и се инкубира 1 h. Негативните контроли включват буфер за разреждане и/или културална среда от нетрансфектирани клетки. Ямките се промиват и се добавя разредена 1:5 000 козя античовешка Капа верига специфична алкална фосфатаза-копюгирано антитяло и се инкубира 30 min. Ямките се промиват и се прибавят 100 microl реакционен буфер и се инкубират 30 min. Реакцията се прекъсва чрез прибавяне на 1 M NaOH и се отчита абсорбцията на 405 nm в устройство за отчитане на ELISA блюда. Резултатите се анализират чрез четири-параметрична итеративна крива на съответствие.

Аминокиселинният анализ се провежда съгласно методите предоставени от състоянието на техниката.

5 Продуцира се моноклонално антитяло  $L_A H_C$  и се пречиства до хомогенност при използване на Protein A афинитетна хроматография. ELISA изследвания, използващи човешки IgG1 като стандарт показват възстановяване на  $L_A H_C$  надвишаващо 70%. Отчита се, че чистотата на 10 продукта е над 90% чрез SDS-полиакриламидна гел електрофореза. Представителни данни за експресията и характерни добиви на пречистване са показани на таблица 21.

Таблица 21. Данни за експресия и добиви от пречистване на FAP протеини на антитялото в СНО клетки

Антитяло	Нива на експресия в проби от сурова Среда (ELISA)	Добиви на пречистеното антитяло	Подобряване на добива (пречистено антитяло)
$L_A H_C$	7-10 mg/ml	~5-7 mg/ml	500-700
$L_A H_D$	5-7 mg/ml	~3-4 mg/ml	300-400
$L_B H_B$	0,5-1 mg/ml	~0,2-0,5 mg/ml	20-50
$I_B H_D$	0,8-1,5 mg/ml	~0,3-0,8 mg/ml	30-60
Химерно F19	~0,02 mg/ml	< 0,01 mg/ml	1

Представени са представителни данни за експресията за всяко от анти-FAP антителита, 35 продуцирани при това изследване. Възстановяването след Protein A агарозна афинитетна хроматография е на основата на измерванията за свързването на протеина с багрило на пречистения Ig при използване на BSA като 40 стандарт.

Пример 12. Свързване на моноклонално антитяло  $L_A H_C$  към изолиран рекомбинантен човешки FAP

45 Цел на настоящото изследване е да се охарактеризира свързването на моноклонално антитяло  $L_A H_C$  към изолиран рекомбинантен човешки FAP.

CD8-FAP ELISA

ELISA блюда се покриват през цялата нощ 50

50 със 100 microl козя античовешка Гама верига специфична алкална фосфатаза-копюгирано антитяло 0,4 mg/ml покривен буфер при 4°C. Покривното антитяло се отстранява и блюдата се блокират с 2% BSA в PBS за 2 h. Всички последващи етапи се извършват при 37°C. Блокиращият буфер се заменя с проби на антитяло или стандарт на човешки IgG1 разреден в буфер за разреждане, разрежда се серийно в обем от 200 ml и се инкубира 1 h. Негативните контроли включват буфер за разреждане и или културална среда от нетрансфектирани клетки. Ямките се промиват и се добавя разредена 1:5 000 козя античовешка капа верига специфична алкална фосфатаза-копюгирано антитяло и се инкубира 1 h. Ямките се промиват и се прибавя 100 microl реакционен буфер и се инкубират 30

30

min. Реакцията се прекъсва чрез прибавяне на 1 М NaOH и се отчита абсорбцията на 405 nm в устройство за отчитане на ELISA блюда. Резултатите се анализират чрез четири-параметрична итеративна крива на съответствие.

Алтернативно, блюдата се покриват директно със cF19. FAP (рекомбинантен човешки FAP, виж пример 13) се оставя да се свърже към тези блюда, както по-горе, след което се прибавя биотиниран  $L_A H_C$  (~1 microg/ml). Свързването на анти тялото се открива с HRP - стрептавидин конюгат, както по-горе.

Разтворимост на свързан към мембраната човешки FAP FAP-експресиращи 293 FAP 1/2 клетки или контролни 293 клетки се промиват с PBS и се лизират с 1% Triton X-114 в буфериран с Tris физиологичен разтвор. Ядрата и клетъчните отломки се отстраняват чрез центрофугиране при 10 000 x g. Супернатантата се подлага на фазово разделяне (Estreicher A, Wohlend A, Belin C), Scheuning WD Vasalli JD. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. (1989) J. Biol. Chem. 264:1180-1189) за обогатяване на протеините на мембраната. Фазата на детергента се събира и се разрежда в буфер съдържащ 1% Empigen BB (Calbiochem), за да се предотврати повторното образуване на агрегат на Triton X-114. Този продукт се подлага на конкавалин А агарозна хроматография (Rettig WJ, garin-Chesa P, Healey JH. Su St., Ozer HL, Schwab, M, Albino AP, Old LJ. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. (1993) Cancer Res 53: 3327-3335).

Биотиниране на  $L_A H_C$ .

$L_A H_C$  (1-2 mg) се диализира срещу 50 тМ бикарбонатен буфер и се биотинира с 10 пъти моларен излишък на сулфосукцинимидил-6-биотинамидо хексаноат (NHS-LC biotin, Pierce Chemical, Rockford, Illinois, USA) в продължение на 2 h при стайна температура. Нереагиращият продукт се отстранява чрез повтаряща се микродиализа в микроконцентратор.

Преходни трансфекции

COS-7 клетки (American Type Tissue Culture Collection, reference number CRI 1661) се котрансфектират чрез електропорация с тежка и лека верига на вектори кодиращи  $L_A H_C$ .

Анти-CDε моноклонално анти тяло се

имобилизира върху микротитърни блюда. CD8-FAP от среда на клетки на насекоми, инфектирани с CD8-FAP бакуловирус се подлагат на свързване към тези блюда. Изтощена среда от COS-7 клетъчни култури преходно трансфектирани с два отделни вектора кодиращи  $L_A H_C$  се разрежда серийно и се прибавя към ямките, съдържащи имобилизиран CD8-FAP.  $L_A H_C$  се свързва към изолирания имобилизиран CD8-FAP протеин (фигура 35). Културалните супернатанти от фалшиво-трансфектирани COS-7 клетки не дават признаци за свързване.

Рекомбинантните детергентни екстракти на FAP свързан към мембраната, на 293FAP 1/2 клетки или на контролните екстракти се разреждат серийно и се имобилизират посредством химерно F19 моноклонално анти тяло, свързано към микротитърните блюда. Биотинираният  $L_A H_C$  свързва рекомбинантния човешки FAP имобилизиран със cF19 (фигура 36) по начин, зависещ от концентрацията.

$L_A H_C$  разпознава изолираният имобилизиран рекомбинантен човешки FAP пренасящ епитопа за миши F19.  $L_A H_C$  се свързва както към CD8-FAP продуциран в клетки на насекоми, така и към FAP протеина продуциран в 293FAP 1/2 клетки.

Супернатанти от култура на COS7 клетки, трансфектирани с вектори или с тежка или с лека верига кодиращи  $L_A H_C$  или без ДНК (контрола) се събират три дни след трансфекцията. CD8-FAP се имобилизират посредством анти-COS анти тяло, както е описано в текста. Серийни разреждания на супернатанти на COS7 се подлагат на свързване към имобилизиран CD8-FAP като впоследствие се определят с HRP-конюгирано античовешко IgG1 анти тяло.

Детергентните екстракти на FAP-експресиращи 293FAP 1/2 клетки или контролни 293 клетки<sup>1</sup> се разреждат серийно и се прибавят към покрити и, с cF19 микротитърни блюда. Биотинираният  $L_A H_C$  се прибавя и свързването на биотиниран  $L_A H_C$  се определя чрез HRP-конюгиран стрептавидин.

Пример 13. Охарактеризиране на HT-1080 фибросаркомни клетки и 293 бъбречни клетки от човешки ембрион трансфектирани със сДНК за човешки FAP

Протеинът за фибробластно активиране (FAP) е клетъчно повърхностен, свързан към

мембраната протеин, който пренася F19 епитопа и се експресира върху тумори на фибробласти на стромата. Клетъчни линии, експресиращи рекомбинантен FAP протеин и съответните контроли, при които липсва FAP, се генерират за охарактеризиране на анти-FAP моноклонални антитела.

Използваните клетки са HT-1080 клетки (номер CCL 121) и 293 бъбречни клетки от човешки ембрион (номер CRL 1573) се получават от American Type Culture Collection (Maryland, USA). Трансфектат се доставя от Promega (Madison, WI). Генектин и всички рестрикционни ензими се получават от Boehringer Mannheim. ДНК за трансфектиране се пречиства от клетки на *E. coli* при използване на QiaFilter Maxi Cartridges (Qiagen) както се препоръчва от производителя. Всички ДНК препарати се изпитват чрез смилане с рестрикционни ензими. Векторните последователности се потвърждават при използване на ABI PRISM 310 Sequencer.

Друга информация по отношение на използваните вектори и ДНК последователности е описана от Scalnan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Heafey JH, Old LJ, Retting WJ. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblast of epithelial cancers. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10832-10836. FAP cDNA последователността е депозирана в Genbank (входящ номер HS09287).

Клетъчно култивиране и имунно изследване

HT-1080 клетки се трансфектират с 1 mg ДНК при използване на трансфектам, съгласно инструкцията на производителя. 293 бъбречни клетки от човешки ембрион се трансфектират чрез калциевофосфатна трансфекция (Brann MR; Brukley NJ; Jones SVP; Bonner 71. Expression of cloned muscarinic receptor in A9 L cells. (1987) Mol. Pharmacol. 32:450-455) с 10 mg ДНК. 24 h по-късно клетките се разреждат в съотношение 1:10 в свежа среда, съдържаща 200 mg/ml генетин. Колониите се взимат и се изпитват чрез имунофлуоресценция за FAP експресия, както е описано от Rettig WJ; Garin-Chesa P; Beresford HR; Oettgen HF; Melamed MR; Old LJ. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas; differential expression in normal and malignant tissues and

cultured cells. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:3110-3114.

Имуноутаяването с cF19 се провежда с метаболитно белязани клетки, както е описано в Rettig WJ; Garin-Chesa P; Healey JH, Su SL, Ozer HI., Schwab, M, Albino AP, Old LJ. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. (1993) Cancer Res 53:3327-3335).

HT-1080 и 293 клетки се тестват за експресия на FAP антиген при имунофлуоресцентни изследвания с анти-FAP антитела, при което се открива, че са антиген-негативни. Трансфектирането на тези клетки с FAP.38 вектор води до генериране на колони резистентни на генетин. Взимат се изолирани колони и се анализират чрез имунофлуоресценция за експресия на FAP. Идентифицират се два клетъчни клона, означени като HT-1080FAP клон 33 и 293FAP 1/2, които експресират FAP протеин, свързан към клетъчната повърхност, както се разпознава чрез cF19 антитяло. Оцветяването на непроницаеми HT-1080FAP клон 33 клетки и 7U31 AP 1/2 с cF19 антитяло потвърждават локализирането върху клетъчната повърхност на FAP протеина.

Имуноутаяването на радиобелязан FAP протеин със cF19 от екстракти на <sup>35</sup>S-метионин белязани HT-1080FAP клон 33 или 293FAP 1/2 клетки води до поява на ивица от 93 килодалтона след автордиография. Тази ивица не се установява в имунопреципитатите от екстракти на родителски HT-1080 или 293 клетки.

Две стабилно трансфектирани клетъчни линии, HT-1080FAP клон 33 клетки и 293FAP 1/2 експресират FAP върху клетъчната повърхност, както е установено при имунологичните изследвания с анти-FAP mAbs. Нито родителските HT-1080<sup>1</sup> клетки, нито родителските 293 клетки не експресират установими нива на FAP.

Пример 14. Генериране и охарактеризиране на CD8-FAP слят протеин

Разтворима форма на човешки FAP (фибробластактивиращ протеин) под формата на CD8-FAP слят протеин се продуцира в клетки на насекоми за охарактеризирането на L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> съдържащ сайта за свързване за анти-FAP mAbs. Мише CD8 се избира, за да се позволи секреция на протеина и за да се предостави допълни-



телен епитоп tag.

сДНК кодираща извънклетъчния домен на CD8, състоящ се от първите 189 аминокиселини на мише CD8a (Genbank M12825), се свързва към извънклетъчния домен на FAP (аминокиселини от 27 до 760), по същество, както е описано от Lane et al. (Lane P, Brocker T, Hubefe S, Padovan IE, Lazavecchia A, McConneii, Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation. (1993) J. Exp. Med. 177:1209-1213) чрез използване на стандартни PCR протоколи. Автентичността на клоновете се проверява чрез ДНК секвениране. Получената Д1 ИК се инсерира в рVI.1393 вектор (Invitrogen) и се провежда трансфекция на Sf9 клетки (Invitrogen) с този вектор и амплифициране на получените рекомбинантни бакуловируси, както е описано (Vacculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA, (Eds.), Oxford University Press: New York, 1984). Изтощената среда от High Five™ (Invitrogen) клетки инфектирана с рекомбинантен CD8-FAP бакуловир в продължение на четири дни се събира и се избистря чрез ултрацентрифугиране.

CD8-FAP ELISA (ензим-свързано имуноабсорбционно изследване) е описано по-горе (пример 12).

Култури от клетки на насекоми, инфектирани със CD8-FAP вирус секретират слят протеин в средата, която пренася F19 епитопа и се разпознава от анти-FAP антитяло (фигура 1). Нито средата на клетъчната култура самостоятелно, нито среда от клетки на насекоми инфектирани със CD8-CD40L слят протеин свързват анти-FAP антитяло.

Разтворим CD8-FAP протеин пренасящ F19 епитопа се секретира в среда от култури на инфектирани клетки на насекоми. Супернатантата от културите от клетки на насекоми инфектирани с контролна структура не съдържат антиген пренасящ F19 епитопа.

Разтворима форма на FAP, CD8-FAP, се продуцира в клетки на насекоми и за CD8-FAP е показано, че пренася епитопа, разпознат чрез cF19.

Супернатанти от клетки на насекоми ин-

фектирани с рекомбинантен бакуловир, кодиращи или CD8-FAP или CD8-CD40L слят протеин се събират четири дни след инфекцията. Среда за клетъчно култивиране без клетки се използва като една допълнителна контрола (среда). Серийно разреждане на тези продукти се прибавя към анти-C138 покрити с антитяло микротитърни блюда и позволяват свързване. Последователно се добавя cF19 (1 mg/ml) и се позволява свързване. Свързаният cF19 се открива с античовешко антитяло конюгирано с пероксидаза от рапица.

### Патентни претенции

1. Протеин на антитяло, съдържащ аминокиселинна последователност, както е посочено в SEQ ID NO: 1.

2. Протеин на антитяло съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че съдържа освен това аминокиселинна последователност, както е посочено в SEQ ID NO: 2.

3. Протеин на антитяло съгласно претенция 1 или 2, характеризиращ се с това, че съдържа освен това аминокиселинна последователност, както е посочено в SEQ ID NO: 3 и аминокиселинна последователност, както е посочено в SEQ ID NO: 4.

4. ДНК молекула, кодираща протеин на антитяло, съгласно която и да е претенция от 1 до 3.

5. Клетка гостоприемник, пренасяща ДНК молекула, съгласно претенция 4.

6. Метод за получаване на протеини на антитяло съгласно която и да е претенция от 1 до 5, характеризиращ се с това, че включва следните етапи:

(а) култивира се клетка гостоприемник съгласно претенция 5, при условия, при които посоченият протеин на антитяло се експресира от посочената клетка гостоприемник, и

(б) изолира се посоченият протеин.

7. Протеин на антитяло съгласно която и да е претенция от 1 до 3, който се конюгира към радиоизотоп, за предпочитане  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ , или  $^{90}\text{Y}$ .

Приложение: 4 фигури

## Фиг. 1

1            11            21            31            41  
 DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSL YSRNQKNYLA WYQQKPGQPP  
 51            61            71            81            91  
 KLLIFWASTRESGVPDRFSG SGFGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYFSY  
 101            111  
 PLTFGQGTKV    EIK

## Фиг. 2

1            11            21            31            41  
 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSRYTFT EYTIHWVRQA PGQRLEWIGG  
 51            61            71            81            91  
 INPNNGIPNY NQKFKGRVTI TVDTSASTAY MELSSLRSSD TAVYYCARRR  
 101            111            121-124  
 IAYGYDEGHA MDYWGQGLTV TVSS

## Фиг. 3

114            124            134            144            154  
 RTVAAPSVFI    FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG  
 164            174            184            194            204  
 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK  
 214-220  
 SFNRGEC

## Фиг. 4

125  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 175  
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHHKPS NTKVDKKVEP  
 225  
 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVVS  
 275  
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 325  
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC  
 375  
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
 425            454  
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

---

Издание на Патентното ведомство на Република България

1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова

Редактор: Р. Георгиева

---

Пор. № 43427

Тираж: 40 СР