РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 412 251** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009122751/10, 15.06.2009**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.06.2009

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **15.06.2009**

(45) Опубликовано: **20.02.2011** Бюл. № **5**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2294939 C2, 10.03.2007. RU 98121682 A, 20.12.2000. RU 2006140081 A, 20.05.2008. WO 2008/052489 A1, 08.05.2008. UniProt/Swiss-Prot, Accession no. P15692. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 2006, 335 (14):1419-1431.**

Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент"

(72) Автор(ы):
Дорохов Юрий Леонидович (RU),
Комарова Татьяна Валерьевна (RU),
Фролова Ольга Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Дорохов Юрий Леонидович (RU)

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И СПОСОБ ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛА В РАСТЕНИИ

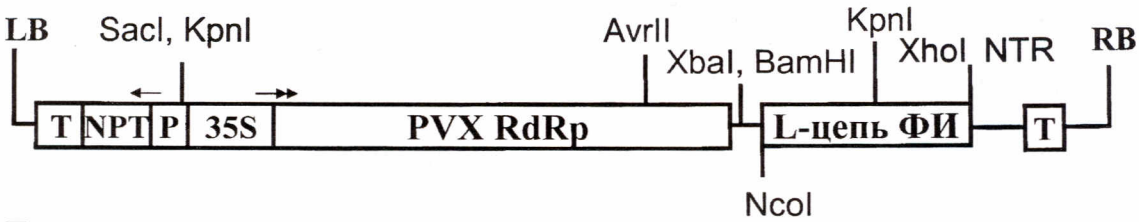
(57) Реферат:

С помощью экспрессионных векторов в клетку растения вводят нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, связывающего VEGF человека. Антитело против VEGF человека может быть использовано, в частности, для снижения микрососудистой проницаемости опухолей человека и лечения диабетической и возрастной неоваскулярной ретинопатии. Продуцирование антитела в клетках растения обеспечивает возможность его получения в промышленных масштабах по существенно более низкой цене, чем при получении в системе экспрессии на основе культуры клеток млекопитающих. Кроме того, исключается присутствие в полученном препарате антитела возбудителей прионных, микоплазменных и вирусных заболеваний млекопитающих. 7 н. и 32 з.п. ф-лы, 4 ил.

RU 2412251 C1

RU 2412251 C1

А. pXBK-L-ФИ



Б. pBTM-H-ФИ

Фиг. 1

RU 2412251 C1

RU 2412251 C1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биотехнологии, генной инженерии и медицине и может быть использовано для создания растений - суперпродуцентов антител, в частности антител против фактора роста сосудистого эндотелия, которые могут быть использованы, например, для снижения микрососудистой проницаемости при различных опухолях человека, включая рак ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы. Антитело против фактора роста сосудистого эндотелия также может быть использовано для лечения диабетической и возрастной неоваскулярной ретинопатии.

Уровень техники

Подавление ангиогенеза, процесса образования новых кровеносных сосудов, является одной из целей противоопухолевой терапии. Фактор роста сосудистого эндотелия (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) является ключевым фактором ангиогенеза, поэтому связывание VEGF антителами и подавление его активности приводит к позитивным эффектам при лечении метастатического рака. В последние годы в практику вошли гуманизированные моноклональные антитела - препарат авастин (бевацизумаб), инактивирующий VEGF, который увеличивает продолжительность жизни раковых больных. Введение авастина приводит к подавлению метастатического прогрессирования заболевания и снижению микрососудистой проницаемости при различных опухолях человека, включая рак толстого кишечника, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы (Cohen et al. 2007. The Oncologist 12, 713-718). В последние годы показано, что авастин (бевацизумаб) оказывает положительный эффект при лечении неоваскулярной макулярной дегенерации, являющейся ведущей причиной слепоты и слабовидения у лиц старшего возраста и больных диабетом (Franzco et al. 2008. Clinical and Experimental Ophthalmology 36, 449-454). Однако этот препарат получают из культуры животных клеток (клетки опухоли яичника китайского хомячка), и он очень дорог. Использование при производстве препарата культуры клеток млекопитающих налагает особые требования в отношении чистоты конечного продукта, который должен быть свободным от возбудителей прионных заболеваний, микоплазм и вирусных патогенов.

В настоящее время в качестве альтернативы для производства терапевтических белков в промышленном масштабе рассматривается технология экспрессии кодирующих такие белки генов в растениях (Villani et al. 2009. Plant Biotechnol J. 7, 59-72), однако пока никому не удалось синтезировать в растении антитело против VEGF.

Раскрытие изобретения

Авторам настоящего изобретения удалось разработать технологию синтеза и очистки из растений полноразмерных антираковых моноклональных антител против VEGF. Эта технология позволяет получать большое количество относительно дешевых препаратов, свободных от прионов, микоплазм и вирусных патогенов. Данное изобретение обеспечивает способ получения в растении антител против VEGF. Одному из полученных способом настоящего изобретения антител против VEGF авторы присвоили название «Фитоинтерцептор» (ФИ). Изобретение описывает: (а) получение генов, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела; (б) разработку векторных систем; (в) синтез антител и их очистку из растений; (г) тестирование антител на способность к взаимодействию с VEGF.

Таким образом, в своем первом аспекте настоящее изобретение относится к

способу продукции в клетке растения антитела, специфически связывающего VEGF человека, или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает в себя:

(а) обеспечение одного или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез легкой, тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc);

(б) введение указанных одного или более векторов в клетку растения;

(в) культивирование клетки растения в условиях, обеспечивающих совместную экспрессию в клетке указанных одного или более векторов.

В одном из воплощений способа легкая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1.

В следующем воплощении способа тяжелая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2.

В следующем воплощении способа один или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез легкой и тяжелой цепи антитела, включают нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 соответственно.

В еще одном воплощении способа клетка растения является изолированной клеткой или находится в составе культивируемого эксплантата (ткани, органа) или в составе целого растения.

В еще одном воплощении способ характеризуется тем, что указанные один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез неамплифицирующейся РНК. В предпочтительном воплощении один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез неамплифицирующейся РНК с помощью индуцибельного промотора.

В следующем воплощении способ характеризуется тем, что один или более экспрессионных векторов представляют собой векторы на основе генома ДНК-содержащего вируса.

В еще одном воплощении способ характеризуется тем, что один или более экспрессионных векторов представляют собой векторы на основе генома РНК-содержащего вируса. В предпочтительном воплощении один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез вирусной РНК с помощью индуцибельного промотора. В более предпочтительном воплощении один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез вирусной РНК с помощью индуцибельного промотора. В следующем более предпочтительном воплощении способ характеризуется тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК вируса табачной мозаики, кодирующей тяжелую цепь антитела. В следующем более предпочтительном воплощении способ характеризуется тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК вируса табачной мозаики, кодирующей легкую цепь антитела. В еще одном более предпочтительном воплощении способ характеризуется тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК Х-вируса картофеля, кодирующей тяжелую цепь антитела. В следующем более предпочтительном воплощении способ характеризуется тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК Х-вируса картофеля, кодирующей легкую цепь антитела.

В еще одном воплощении способ характеризуется тем, что экспрессионные векторы обеспечивают синтез легкой и тяжелой цепи антитела в одной и той же клетке. В предпочтительном воплощении используют вирусные экспрессионные векторы, неспособные конкурировать друг с другом в одной и той же клетке.

В следующем воплощении способ характеризуется тем, что антитело

дополнительно содержит сигнальный пептид, обеспечивающий адресацию антитела в клеточный компартмент или секрецию за пределы клетки.

В еще одном воплощении способ характеризуется тем, что антитело принадлежит к иммуноглобулину класса G, или A, или M, или D, или E.

В еще одном воплощении способ характеризуется тем, что растительная клетка является клеткой двудольного или однодольного растения. В предпочтительном воплощении двудольное растение принадлежит к семейству пасленовых. В более предпочтительном воплощении растением семейства пасленовых является растение рода Nicotiana. В наиболее предпочтительном воплощении растением рода Nicotiana является N. tabacum или N. benthamiana. В еще одном предпочтительном воплощении двудольным растением является растение семейств Brassicacea, Legume или Chenopodiaceae.

В следующем воплощении способ характеризуется тем, что один или более экспрессионных векторов вводят в клетку растения путем агроинъекции.

В еще одном воплощении способ характеризуется тем, что один или более экспрессионных векторов, вводимых в клетку растения, являются экспрессионными векторами для стабильной трансформации.

Наконец, еще в одном воплощении способ характеризуется тем, что один или более экспрессионных векторов, вводимых в клетку растения, являются экспрессионными векторами для транзиентной трансформации.

В своем следующем аспекте настоящее изобретение относится к растительной клетке, продуцирующей антитело, специфически связывающее VEGF человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, которую получают путем введения одного или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез тяжелой, легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc).

В одном из воплощений растительная клетка характеризуется тем, что один или более экспрессионных векторов, направляющих синтез легкой и тяжелой цепи антитела, включают нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 соответственно.

В еще одном из воплощений растительная клетка характеризуется тем, что она является стабильно-трансформированной.

В следующем воплощении растительная клетка характеризуется тем, что она является транзиентно-трансформированной.

В своем следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу, специфически связывающему VEGF человека, которое получено способом настоящего изобретения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, специфически связывающему VEGF человека, которое содержит аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO: 2 соответственно.

В одном из воплощений антитело характеризуется тем, что его легкая и тяжелая цепи включают последовательности, соответствующие нуклеотидным последовательностям, представленным SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 соответственно.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, направляющему в клетке растения синтез легкой и/или тяжелой цепи антитела, специфически связывающего VEGF человека, или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc).

В одном из воплощений экспрессионный вектор, направляющий в клетке растения

синтез легкой цепи антитела против VEGF, включает нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO:3. В предпочтительном воплощении экспрессионный вектор содержит (в указанном порядке) левую часть участка встраивания в геном растения бинарного вектора; нопалинсинтазный терминатор; ген неомицинфосфотрансферазы; нопалинсинтазный транскрипционный промотор; 35S транскрипционный промотор ВМЦК; ген репликазы ХВК, ген легкой цепи антитела против VEGF, представленный SEQ ID NO:3; 3'-нетранслируемую область геномной РНК ХВК; 35S терминатор ВМЦК; правую часть участка встраивания в геном растения.

В еще одном из воплощений экспрессионный вектор, направляющий в клетке растения синтез тяжелой цепи антитела против VEGF, включает нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO:4. В предпочтительном воплощении экспрессионный вектор содержит (в указанном порядке) левую часть участка встраивания в геном растения; нопалинсинтазный терминатор; ген неомицинфосфотрансферазы; нопалинсинтазный транскрипционный промотор; актиновый транскрипционный промотор 2 из арабидопсиса; ген репликазы крВТМ; ген транспортного белка крВТМ, ген тяжелой цепи антитела против VEGF, представленный SEQ ID NO:4; 3'-нетранслируемую область геномной РНК крВТМ; нопалинсинтазный терминатор; правую часть участка встраивания в геном растения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против VEGF настоящего изобретения, где молекула нуклеиновой кислоты включает последовательность, представленную SEQ ID NO:3.

Наконец, еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против VEGF настоящего изобретения, где молекула нуклеиновой кислоты включает последовательность, представленную SEQ ID NO:4.

Краткое описание фигур

Фиг.1. Схема строения бинарных векторов, кодирующих ФИ.

А - Вектор рХВК-L-ФИ, кодирующий легкую (L) цепь антитела ФИ, где (слева направо) LB - левая часть участка встраивания в геном растения бинарного вектора; Т - нопалинсинтазный терминатор; NPT - ген неомицинфосфотрансферазы; Р - нопалинсинтазный транскрипционный промотор; 35S - транскрипционный промотор ВМЦК; PVX RdRp - репликаза ХВК, L-цепь - легкая цепь; NTR - 3'-нетранслируемая область геномной РНК ХВК; Т - 35S терминатор ВМЦК; RB - правая часть участка встраивания в геном растения бинарного вектора. Стрелки показывают направление транскрипции.

Б - Вектор рВТМ-Н-ФИ, кодирующий тяжелую (Н) цепь антитела ФИ, где (слева направо) LB - левая часть участка встраивания в геном растения бинарного вектора; Т - нопалинсинтазный терминатор; NPT - ген неомицинфосфотрансферазы; Р - нопалинсинтазный транскрипционный промотор; Act2 - актиновый транскрипционный промотор 2 из арабидопсиса; ген репликазы крВТМ; ТБ - транспортный белок крВТМ, Н-цепь - тяжелая цепь; NTR - 3'-нетранслируемая область геномной РНК крВТМ; Т - нопалинсинтазный терминатор; RB - правая часть участка встраивания в геном растения бинарного вектора. Стрелки показывают направление транскрипции.

Фиг.2. Очистка анти-VEGF антитела ФИ. Показаны результаты ЭФ в полиакриламидном геле в невосстанавливающих (А) и восстанавливающих (Б)

условиях; гель окрашен Кумасси синим. Дорожки 1-10: 1 - белковые фракции ФИ после очистки на колонке с протеин-А-сефарозой - 1-я экстракция; 2-3-я экстракция; 3 - промывочная фракция; 4 - ФИ; 5 - промывочная фракция; 6 - контрольные антитела человека (hIgG) - 1 мкг; 7 - маркеры; 8 - TNFR-Fc; 9 - промывочная фракция; 10 - ФИ, образец предыдущего выделения.

Фиг.3. Тестирование анти-VEGF антитела ФИ специфическими антителами. Показаны результаты ЭФ в полиакриламидном геле в невосстанавливающих (А, Б) и восстанавливающих (В, Г) условиях. Вестерн-блоты тестировали антителами к гамма (тяжелой)-цепи (А, В) и каппа (легкой)-цепи (Б, Г). Дорожки 1,2 - фракции после очистки на колонке с протеин-А-сефарозой. М - маркеры. S - контрольные антитела человека (hIgG) - 1 мкг.

Фиг.4. Тестирование способности анти-VEGF антитела ФИ связывать рекомбинантный VEGF человека.

А - Результаты анализа рекомбинантного VEGF человека, синтезированного в E.coli и очищенного на Ni-NTA-колонке, методом ЭФ в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; гель окрашен Кумасси синим.

Б - Анализ экстракта клеток E.coli, экспрессирующих VEGF человека, методом Вестерн-блоттинга с использованием анти-VEGF антитела ФИ.

В - Сравнительный анализ очищенного препарата VEGF человека методом Вестерн-блоттинга с использованием анти-VEGF антител ФИ и авастина (Хоффман-ЛяРош) (верхняя и средняя панели). Верхняя панель - экспозиция с рентгеновской пленкой 1 мин, средняя панель - экспозиция с рентгеновской пленкой 3 мин. Нижняя панель: Е2, Е3, Е4 - фракции hVEGF165 с колонки с Ni-NTA-Агарозой. - К - отрицательный контроль. Гель окрашен Кумасси синим.

Осуществление изобретения

В основе настоящего изобретения лежит тот неожиданно обнаруженный авторами изобретения факт, что гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела против VEGF, могут быть экспрессированы в клетке растения с получением полностью функционального антитела, специфически связывающегося со «своим» антигеном. Предложенный способ включает создание одного или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез тяжелой (Н) и легкой (L) цепи антитела, введение указанных векторов в клетку растения и культивирование клетки растения в условиях, обеспечивающих совместную экспрессию в клетке указанных генов тяжелой (Н) и легкой (L) цепи антитела. Предложенный способ может быть использован для экспрессии любых антираковых антител, если их аминокислотная и/или нуклеотидная последовательность известна.

В настоящее время известны антитела против VEGF, которые могут быть использованы для снижения микрососудистой проницаемости при различных опухолях человека. В частности, гены, кодирующие антитело против VEGF, можно синтезировать и экспрессировать с помощью вирусных векторов. Антитело против VEGF может образовываться как с реплицирующихся векторов, созданных на основе вирусных геномов (см. Пример 1), так и с неамлифицирующихся моно- или полицистронных мРНК с помощью участка внутренней посадки рибосом IRES (Dorokhov et al. 2002. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99, 5301-5306). В качестве конкретного примера осуществления настоящего изобретения экспрессионные векторы, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела против VEGF, могут быть созданы на основе бинарного вектора Bin19 (см. Фиг.1 и 3, Пример 2). Эти векторы обеспечивают синтез и накопление в растении антитела в количестве, достаточном для выделения и

очистки (см. Фиг.2, Пример 2).

Преимущество настоящего изобретения состоит в том, что оно обеспечивает возможность продуцирования в растении не только полноразмерных антител, но их антигенсвязывающих фрагментов, например dsFv, scFv, scFv-Fc, а также антител млекопитающих семейства Camelidae, которые содержат только тяжелые цепи (см. обзор Jam et al. 2007. Trends in Biotechnology 25, 307-316). Антитело может принадлежать к любому из известных классов иммуноглобулинов - классу G, или A, или M, или D, или E.

В том случае, когда легкая и тяжелая цепи антитела кодируются последовательностями, находящимися в составе двух различных вирусных векторов, одновременная экспрессия цепей антитела в растительной клетке возможна при условии отсутствия конкуренции между используемыми вирусными векторами. Наши эксперименты показывают, что ВТМ и ХВК не только не конкурируют между собой, но ХВК даже стимулирует репродукцию ВТМ. Накопление тяжелой цепи с ВТМ-вектора увеличивается в присутствии ХВК, кодирующего легкую цепь антитела.

Настоящее изобретение также предусматривает использование невирусных векторов для синтеза в растительной клетке антитела. Эти векторы не конкурируют между собой в цитоплазме. Однако их синтез и стабильность в цитоплазме находятся под контролем механизма «умолкания» (сайленсинга) генов. Использование антисайленсинговых белков, например белка P19 вируса кустистой карликовости томатов, снимает и эту проблему (Hamilton et al. 2002. EMBO J. 21, 4671-4679).

Растительная клетка, продуцирующая антитело, может быть в виде изолированной клетки, лишенной клеточной стенки (протопласт), или в составе культивируемого эксплантата (ткань, орган) или целого растения. Культивирование клеток в искусственных условиях происходит в стерильной среде известного состава и в контролируемых условиях при постоянной температуре (26-28°C) и освещенности (Plant Cell Culture Protocols. Edited by Robert D. Hall - CPRO-DLO, Wageningen, The Netherlands). Антитело может накапливаться внутри растительной клетки или с помощью введения в его состав сигнальной последовательности может быть экспортировано в культуральную среду. Извлечение антитела можно осуществлять из внутриклеточного содержимого путем разрушения клеток культуры или непосредственно из культуральной среды. Включение в состав антитела сигнальной последовательности, обеспечивающий адресацию антитела в клеточный компартмент или секрецию за пределы клетки, облегчает выделение антитела. В качестве таких сигнальных последовательностей могут использоваться апопластные сигналы (Lee et al. 2004. Plant Physiol. Biochem. 42, 979-988).

ДНК, кодирующая цепи антитела, может быть введена в растительную клетку известными для специалиста способами, например с помощью электропорации, бомбардирования микроснарядами, микроинъекций и посредством инфицирования вирусом (Jones et al. 2009. Methods Mol. Biol. 513, 131-152). Кроме того, в растительную клетку ДНК может быть доставлена с помощью Agrobacterium tumefaciens. Для транзиентной экспрессии чужеродного гена в листовой ткани чаще используют метод агроинфильтрации и агроинокуляции (Kapila et al. 1997. Plant Science 122, 101-108). Трансформация растительных клеток может быть стабильной, сопровождающейся интеграцией вводимой ДНК в клеточный геном. Желаемый эффект также может быть достигнут при введении в ядро ДНК и транзиентном (временном) синтезе РНК без стабильной интеграции ДНК в хозяйский геном (см. Пример 1).

Важным и решающим преимуществом настоящего изобретения является то, что

система синтеза антитела против VEGF, в частности антитела ФИ в растении, обеспечивает высокий уровень продукции дешевого белка. Наши эксперименты показывают, что из 1 кг листьев N. benthamiana можно выделить до 300-500 мг очищенного антитела (3-5% от растворимого белка). С помощью хроматографии на колонке с протеином G или A можно получить чистый препарат антитела против онкогена VEGF (Фиг.2). Этот препарат обладает способностью связывать VEGF человека, как это показано в Вестерн-блот анализе (Фиг.4). Наши оценки показывают, что стоимость препарата ФИ, полученного при экспрессии в клетке растения, может быть в 10-20 раз ниже стоимости аналогичного препарата, полученного из животных клеток CHO. Важно добавить, что в ходе получения антитела не используются какие-либо материалы животного происхождения (в частности, сыворотки), что гарантирует отсутствие прионов, вирусов, микоплазм в получаемом продукте.

Примеры

Следующие далее примеры раскрывают наиболее предпочтительные воплощения данного изобретения и приведены исключительно с целью лучшего пояснения его сущности. Специалисту в данной области будет понятно, что можно осуществить множество модификаций как в отношении используемых средств и материалов, так и в отношении используемых способов без отступления за рамки изобретения.

Пример 1. Продукция ФИ в растении.

На первом этапе проводили пептидный анализ антитела против VEGF авастина (Хоффман-ЛяРош, Швейцария) по следующей методике.

Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле, окрашенном Coomassie Brilliant Blue (G-250), проводили следующим образом: вырезали кусочек геля размером 1×1 мм, который дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1 M NH_4HCO_3 в течение 30 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega, США) в 0,05 M NH_4HCO_3 с концентрацией 15 мкг×мл$^{-1}$. Гидролиз проводили в течение 16 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 10 мкл 0,5% ТФУ в 10% растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Супернатант использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили следующим образом: на мишени смешивали по 0,5 мкл раствора образца и раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (Aldrich, США, 10 мг×мл$^{-1}$ в 20% водном растворе ацетонитрила, содержащем 0,5% ТФУ) и полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,007%.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в «домашней» базе данных, куда предварительно ввели искомые последовательности (к укороченным последовательностям были введены соответствующие хвосты) с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Необходимо отметить, что аминокислотная последовательность использованного в

очищенный на Ni-NTA-колонке (Фиг.4А). Очистку рекомбинантного VEGF проводили в соответствии с инструкциями производителя (Novagen, США). Вестерн-блот анализ экстракта клеток E.coli, продуцирующих VEGF человека, с помощью антитела настоящего изобретения ФИ показывает специфическую активность ФИ (Фиг.4Б). Кроме того было проведено сравнение активности ФИ и коммерчески доступного моноклонального антитела против VEGF авастина (Хоффман-ЛяРош, Швейцария). Из Фиг.4В видно, что продуцированное в растении антитело ФИ обладает более высокой активностью в сравнении с авастином.

Все патенты, публикации, научные статьи и другие документы и материалы, цитируемые или упоминаемые здесь, включены в настоящее описание путем отсылки в такой степени, как если бы каждый из этих документов был включен путем отсылки индивидуально или приведен здесь в его полном виде.

Конкретные гены, векторы, виды растений, применения, используемые материалы и методы, описанные здесь, относятся к предпочтительным вариантам осуществления, приведены в качестве примеров и не предназначены для ограничения объема данного изобретения. При изучении этого описания другие объекты, аспекты и воплощения будут приходить в голову специалистам в данной области, и они охватываются рамками данного изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, что различные замены и модификации могут быть произведены в отношении описанного здесь изобретения без отклонения от его объема и рамок, которые определяются прилагаемой формулой изобретения.

SEQUENCE LISTING

<110> ДОРОХОВ, Юрий Леонидович
DOROKHOV, Yuri Leonidovich

<120> АНТИТЕЛО ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И СПОСОБ ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛА В РАСТЕНИИ

<130> R09100150/44n

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-VEGF antibody light chain

<400> 1

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
35 40 45

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 2
<211> 454
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-VEGF antibody heavy chain

<400> 2

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asn
20 25 30

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp
50 55 60

Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 3

<211> 648
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS for anti-VEGF antibody light chain

<400> 3
atggacatac aaatgaccca gtctccaagt tctctatccg cttccgttgg tgacagggtt 60

actataacat gttcggcgag tcaagatata tccaattatc tgaactggta tcagcaaaaa 120

cctgggaagg cccctaaagt attgatatac tttacatcga gccttcattc aggagtgccg 180

tcaagatttt caggctcggg cagcgggacg gatttcactt taacaataag ctctctccaa 240

ccagaagatt ttgcaactta ctattgccag caatacagta cggtgccctg gaccttcgga 300

cagggtacaa aggtggagat caaacgtact gtggccgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 4
<211> 1362
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS for anti-VEGF antibody heavy chain

<400> 4
atggaagtgc aattggtcga gtccggaggt ggactagtcc aacccggagg ctcgttacgt 60

ctctcatgcg cggcaagcgg ctatgatttt acaaattacg gtatgaactg ggtaagacag 120

gctccaggta agggcctaga atgggttggg tggataaaca cttacacggg tgagccgaca 180

tacgctgcag acttcaaaag gcggtttacc ttttctttag acactagcaa gtcgacagcc 240

tatcttcaaa tgaattcact gcgagccgaa gatacggcgg tatattactg tgcaaaatat 300

cctcattatt acggatctag tcactggtat ttcgatgttt gggggcaggg gaccttggtg 360

actgtaagtt ccgcaagcac taaaggtccc tcagtatttc cattggcacc cagctctaaa 420

agtacctctg ggggtactgc tgccttagga tgcctcgtga aagattattt cccagaacct 480

gtaacagtat cctggaattc tggggcgtta actagtggtg ttcatacgtt tccagccgta 540

ctccagtcat ctgggctcta ttctctgagt tctgttgtga cagttccgtc gagttcgtta 600

ggaacacaaa catatatatg taacgttaac cacaaaccaa gtaacaccaa ggtcgacaaa 660

aaggtggagc cgaaaagctg tgataagacg catacatgtc ctccctgtcc ggcgcctgaa 720

ctgctaggtg gcccctcagt atttctgttt ccacccaaac cgaaagatac tctaatgata 780

tcgagaacgc ctgaagtcac atgcgttgta gtcgacgtct cgcacgaaga ccctgaggtt 840

aagttcaatt ggtacgtaga tggcgttgaa gtgcacaatg caaagacaaa accccgagag 900

gaacaatata actccactta ccgggtggta tccgtattaa ctgtgttgca ccaagactgg 960

ctaaacggca aggaatacaa gtgtaaggta agcaataaag cgcttcctgc cccaatagag 1020

aagacaataa gcaaggctaa gggacaaccg agagagccgc aggtctatac gttgcctccc 1080

agtcgtgaag agatgactaa aaatcaagtg tcattgacct gcctagtcaa ggggttttac 1140

ccgtcagaca tagcagttga gtgggaatca aacggccaac cagaaaataa ctataaaacc 1200

acgccgcctg tgcttgattc cgatggttcc tttttcttgt actcgaagtt aaccgtcgat 1260

aaaagtaggt ggcaacaggg taatgtattc tcatgctccg ttatgcatga agctttacat 1320

aatcattata cccagaaaag cctatcgctt tcgccaggaa ag 1362

Формула изобретения

1. Способ продукции в клетке растения антитела, специфически связывающего VEGF человека, или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает в себя:

(а) обеспечение одного или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез легкой и тяжелой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc);

(б) введение указанных одного или более векторов в клетку растения;

(в) культивирование клетки растения в условиях, обеспечивающих совместную экспрессию в клетке указанных одного или более векторов, причем легкая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, а тяжелая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2.

2. Способ по п.1, в котором указанные один или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез легкой и тяжелой цепей антитела, включают нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 соответственно.

3. Способ по п.1, в котором клетка растения является изолированной клеткой или находится в составе культивируемого эксплантата (ткани, органа) или в составе целого растения.

4. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез неамплифицирующейся РНК.

5. Способ по п.4, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез неамплифицирующейся РНК с помощью индуцибельного промотора.

6. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов представляют собой векторы на основе генома ДНК-содержащего вируса.

7. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов представляют собой векторы на основе генома РНК-содержащего вируса.

8. Способ по п.6, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез вирусной РНК с помощью индуцибельного промотора.

9. Способ по п.7, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов обеспечивают синтез вирусной РНК с помощью индуцибельного промотора.

10. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК вируса табачной мозаики, кодирующей тяжелую цепь антитела.

11. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК вируса табачной мозаики, кодирующей легкую цепь антитела.

12. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК X-вируса картофеля, кодирующей тяжелую цепь антитела.

13. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК X-вируса картофеля, кодирующей легкую цепь антитела.

14. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные экспрессионные векторы обеспечивают синтез легкой и тяжелой цепей антитела в одной и той же клетке.

15. Способ по п.14, характеризующийся тем, что используют вирусные экспрессионные векторы, не способные конкурировать друг с другом в одной и той же клетке.

16. Способ по п.1, характеризующийся тем, что антитело дополнительно содержит сигнальный пептид, обеспечивающий адресацию антитела в клеточный компартмент или секрецию за пределы клетки.

17. Способ по п.1, в котором антитело принадлежит к иммуноглобулину класса G, или A, или M, или D, или E.

18. Способ по п.1, характеризующийся тем, что растительная клетка является клеткой двудольного или однодольного растения.

19. Способ по п.18, характеризующийся тем, что двудольное растение принадлежит к семейству пасленовых.

20. Способ по п.19, характеризующийся тем, что растением семейства пасленовых является растение рода Nicotiana.

21. Способ по п.20, характеризующийся тем, что растением рода Nicotiana является N.tabacum или N. benthamiana.

22. Способ по п.18, характеризующийся тем, что двудольным растением является растение семейств Brassicacea, Legume или Chenopodiaceae.

23. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов вводят в клетку растения путем агроинъекции.

24. Способ по любому из пп.1-23, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов, вводимых в клетку растения, являются экспрессионными векторами для стабильной трансформации.

25. Способ по любому из пп.1-23, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов, вводимых в клетку растения, являются экспрессионными векторами для транзиентной трансформации.

26. Растительная клетка, продуцирующая антитело, специфически связывающее VEGF человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, полученная введением одного или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc), причем легкая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1, а тяжелая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2

27. Растительная клетка по п.26, в которой один или более экспрессионных векторов, направляющих синтез легкой и тяжелой цепей антитела, включают

нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 соответственно.

28. Растительная клетка по п.26, которая является стабильно трансформированной.

29. Растительная клетка по п.26, которая является транзиентно трансформированной.

30. Антитело, специфически связывающее VEGF человека, полученное способом по любому из пп.1-25.

31. Антитело, специфически связывающее VEGF человека, содержащее аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей, представленные SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 соответственно.

32. Антитело по п.31, легкая и тяжелая цепи которого включают последовательности, соответствующие нуклеотидным последовательностям, представленным SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 соответственно.

33. Экспрессионный вектор, направляющий в клетке растения синтез легкой и/или тяжелой цепи антитела, специфически связывающего VEGF человека, или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc), причем легкая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1, а тяжелая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2.

34. Экспрессионный вектор по п.33, направляющий в клетке растения синтез легкой цепи антитела против VEGF, включающий нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO:3.

35. Экспрессионный вектор по п.33, направляющий в клетке растения синтез тяжелой цепи антитела против VEGF, включающий нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO:4.

36. Экспрессионный вектор по п.34, содержащий (в указанном порядке) левую часть участка встраивания в геном растения бинарного вектора; нопалинсинтазный терминатор; ген неомицинфосфотрансферазы; нопалинсинтазный транскрипционный промотор; 35S транскрипционный промотор ВМЦК; ген репликазы ХВК, ген легкой цепи антитела против VEGF, представленный SEQ ID NO:3; 3'-нетранслируемую область геномной РНК ХВК; 35S терминатор ВМЦК; правую часть участка встраивания в геном растения.

37. Экспрессионный вектор по п.35, содержащий (в указанном порядке) левую часть участка встраивания в геном растения; нопалинсинтазный терминатор; ген неомицинфосфотрансферазы; нопалинсинтазный транскрипционный промотор; актиновый транскрипционный промотор 2 из арабидопсиса; ген репликазы крВТМ; ген транспортного белка крВТМ, ген тяжелой цепи антитела против VEGF, представленный SEQ ID NO:4; 3'-нетранслируемую область геномной РНК крВТМ; нопалинсинтазный терминатор; правую часть участка встраивания в геном растения.

38. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела против VEGF по п.31, включающая последовательность, представленную SEQ ID NO:3.

39. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь антитела против VEGF по п.31, включающая последовательность, представленную SEQ ID NO:4.

10. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК вируса табачной мозаики, кодирующей тяжелую цепь антитела.

11. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК вируса табачной мозаики, кодирующей легкую цепь антитела.

12. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК X-вируса картофеля, кодирующей тяжелую цепь антитела.

13. Способ по п.7, характеризующийся тем, что экспрессионный вектор обеспечивает синтез РНК X-вируса картофеля, кодирующей легкую цепь антитела.

14. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные экспрессионные векторы обеспечивают синтез легкой и тяжелой цепей антитела в одной и той же клетке.

15. Способ по п.14, характеризующийся тем, что используют вирусные экспрессионные векторы, не способные конкурировать друг с другом в одной и той же клетке.

16. Способ по п.1, характеризующийся тем, что антитело дополнительно содержит сигнальный пептид, обеспечивающий адресацию антитела в клеточный компартмент или секрецию за пределы клетки.

17. Способ по п.1, в котором антитело принадлежит к иммуноглобулину класса G, или A, или M, или D, или E.

18. Способ по п.1, характеризующийся тем, что растительная клетка является клеткой двудольного или однодольного растения.

19. Способ по п.18, характеризующийся тем, что двудольное растение принадлежит к семейству пасленовых.

20. Способ по п.19, характеризующийся тем, что растением семейства пасленовых является растение рода Nicotiana.

21. Способ по п.20, характеризующийся тем, что растением рода Nicotiana является N.tabacum или N. benthamiana.

22. Способ по п.18, характеризующийся тем, что двудольным растением является растение семейств Brassicacea, Legume или Chenopodiaceae.

23. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов вводят в клетку растения путем агроинъекции.

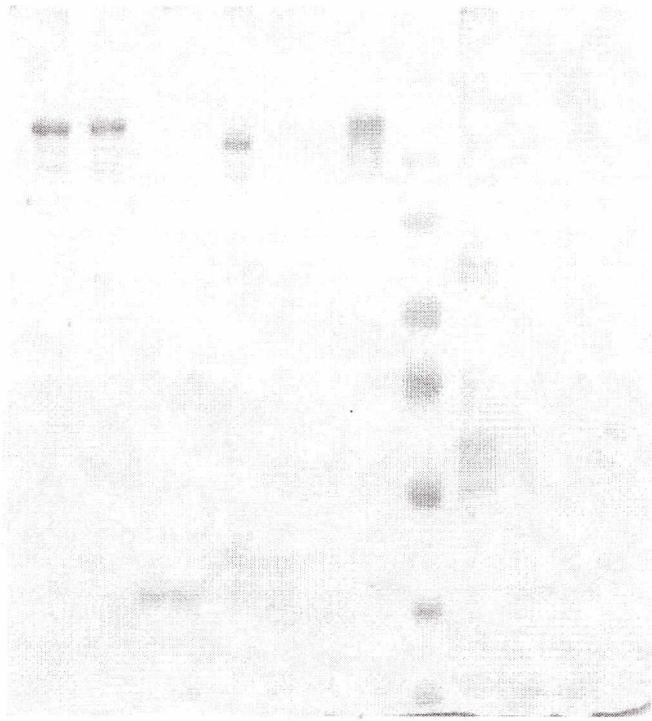
24. Способ по любому из пп.1-23, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов, вводимых в клетку растения, являются экспрессионными векторами для стабильной трансформации.

25. Способ по любому из пп.1-23, характеризующийся тем, что указанные один или более экспрессионных векторов, вводимых в клетку растения, являются экспрессионными векторами для транзиентной трансформации.

26. Растительная клетка, продуцирующая антитело, специфически связывающее VEGF человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, полученная введением одного или более экспрессионных векторов, направляющих в клетке растения синтез тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (dsFv, scFv, scFv-Fc), причем легкая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1, а тяжелая цепь антитела включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2

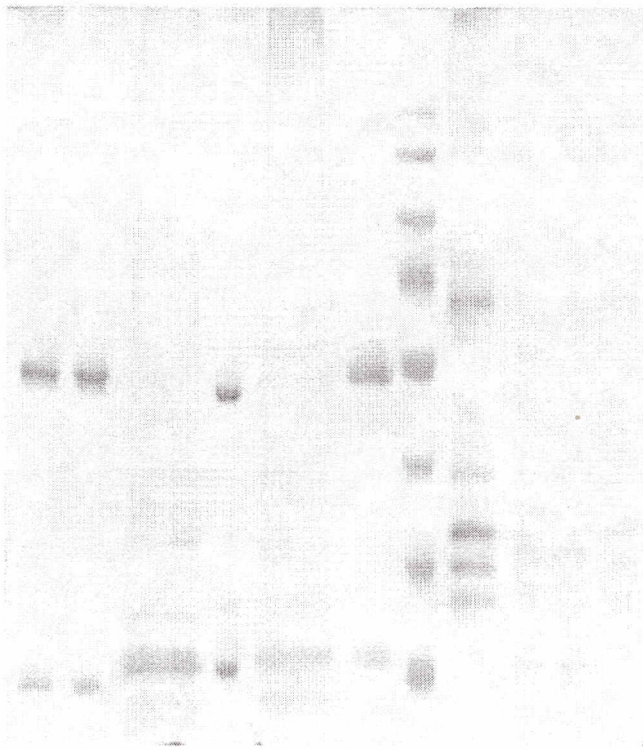
27. Растительная клетка по п.26, в которой один или более экспрессионных векторов, направляющих синтез легкой и тяжелой цепей антитела, включают

А

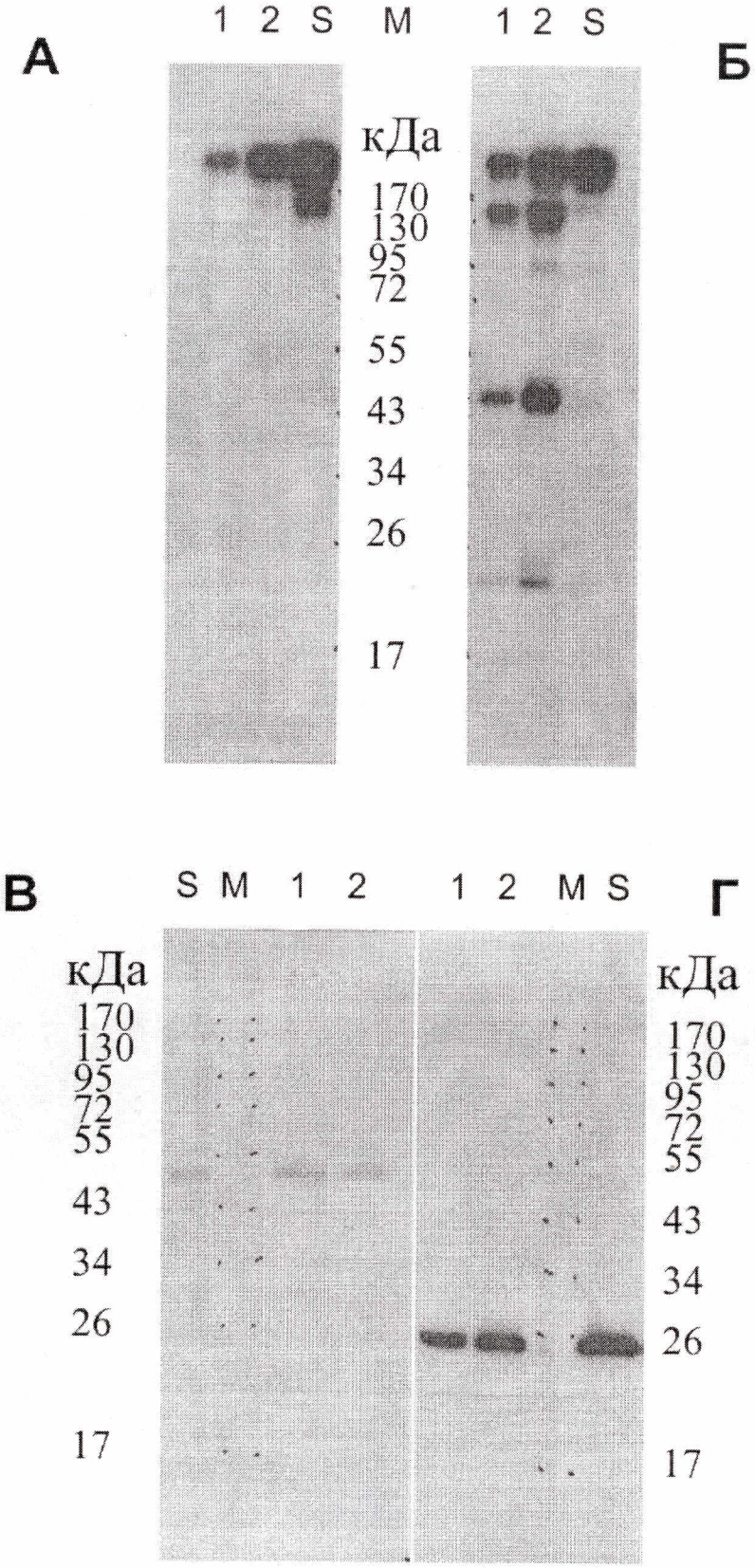


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

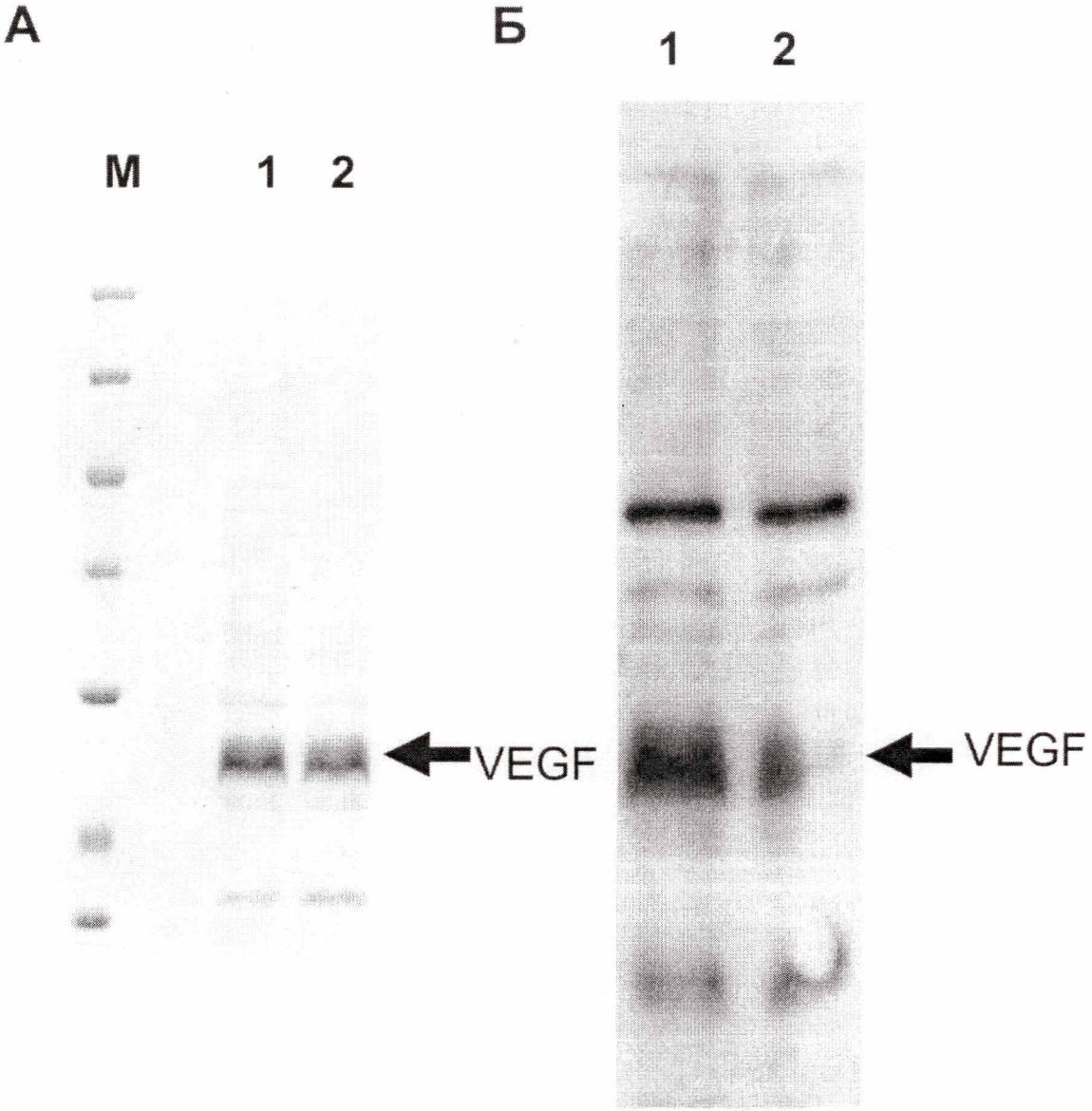
Б



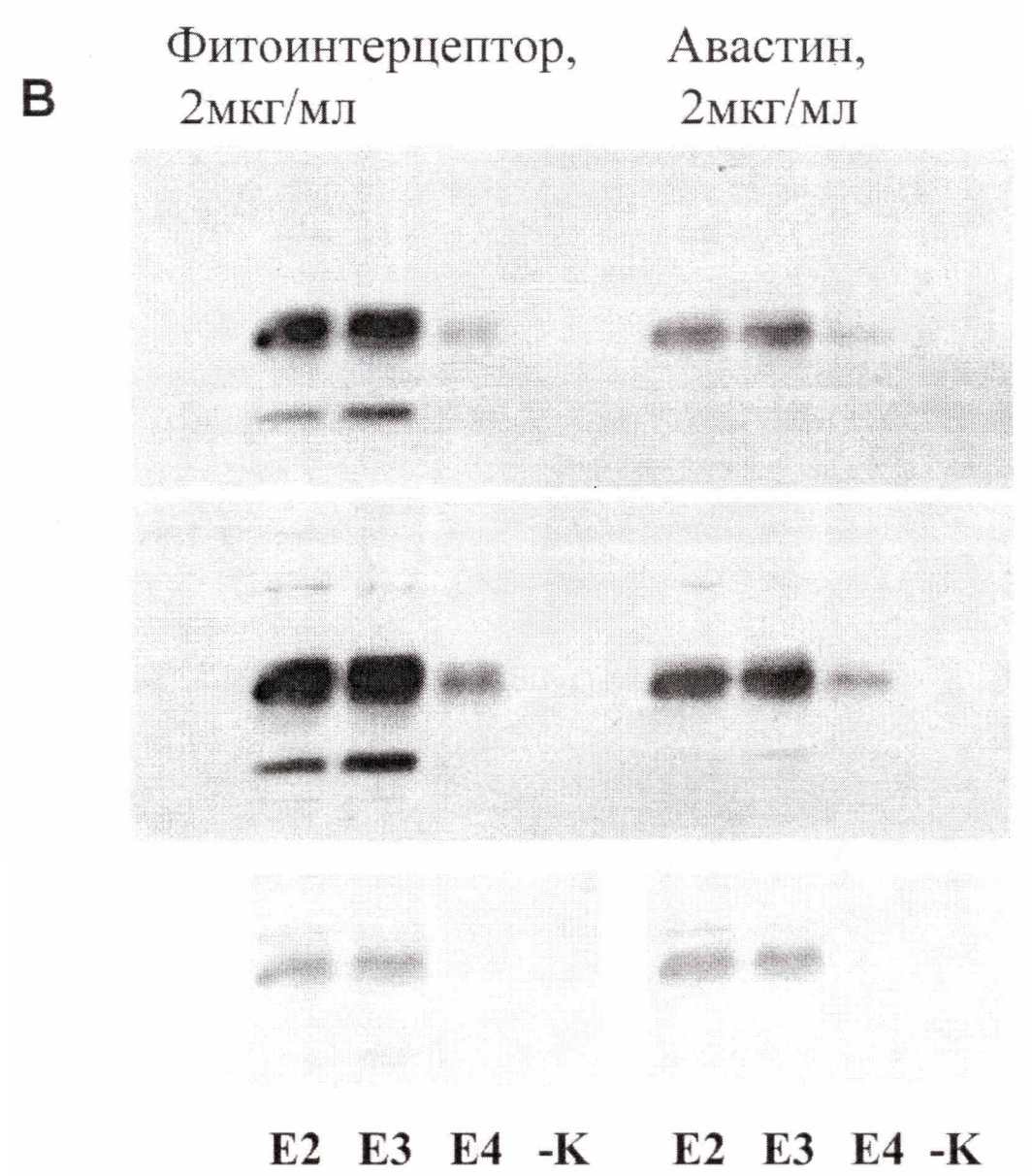
Фиг. 2


А
1 2 S M
кДа
170
130
95
72
55
43
34
26
17
Б
1 2 S
В
S M 1 2
кДа
170
130
95
72
55
43
34
26
17
Г
1 2 M S
кДа
170
130
95
72
55
43
34
26
17

Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 4 (продолжение)