



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116995** (13) **C2**

(51) МПК (2018.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 03410</p> <p>(22) Дата подання заявки: 12.09.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.06.2018</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: PCT/EP2012/003819, 61/776,715</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12.09.2012, 11.03.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 12.10.2015, Бюл.№ 19</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.06.2018, Бюл.№ 11</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2013/059481, 12.09.2013</p>	<p>(72) Винахідник(и): Пан Кларк (US), Цю Хуавей (US)</p> <p>(73) Власник(и): ДЖЕНЗІМ КОРПОРЕЙШН, 500 Kendall Street, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2004099249 A2, 18.11.2004 Chan A. C. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation / Andrew C. Chan, Paul J. Carter // Immunology. – 2010. - Vol. 10(5). - P. 301-316 High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcγRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR / Robert L. Shields, Angela K. Namenuk, Kyu Hong et. al. // The journal of biological. – 2001. - Vol. 276(9). - P. 6591-6604 When binding is enough: nonactivating antibody formats / Aran F. Labrijn, Rob C. Aalberse, Janine Schuurman // Current opinion in immunology. – 2008. - Vol. 20. - P. 479–485 Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function / Qun Zhou, Srinivas Shankara, Andre Roy et. al. // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. - Vol. 99 (3). - P. 652-665</p>
---	--

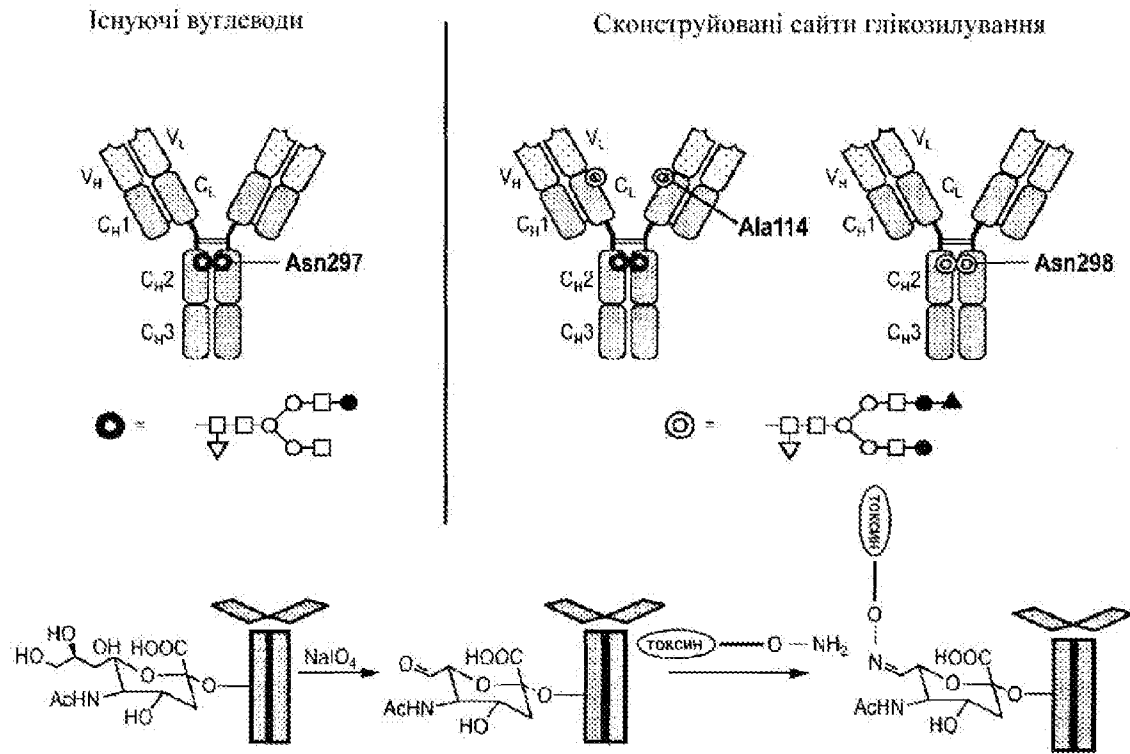
(54) ВИДІЛЕНЕ АНТИТІЛО, ЩО ВКЛЮЧАЄ ДОМЕН Fc ЗІ ЗМІНЕНИМ ГЛІКОЗИЛУВАННЯМ І ЗНИЖЕНОЮ ЕФЕКТОРНОЮ ФУНКЦІЄЮ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного антитіла або його антигензв'язувального фрагменту, що включає домен Fc, виділеного поліпептиду, що кодує антитіло, вектора, клітини-хазяїна та способу

UA 116995 C2

одержання такого антитіла. Винахід також стосується композиції, що включає антитіло, та її застосування як лікарського засобу.



Фиг. 1

Споріднені заявки

У цій заявці вимагається пріоритет міжнародної патентної заявки № PCT/EP2012/003819, озаглавленої "Антитіла проти альфа-бетаTCR", поданої 12 вересня 2012 р., і попередньої заявки США № 61/776715, озаглавленої "Поліпептиди, що містять Fc зі зміненим глікозилюванням і зниженою ефекторною функцією", поданої 11 березня 2013 р.

Ця заявка також стосується попередньої заявки США № 61/776724, озаглавленої "Сайт-специфічне антитіло, кон'юговане з ліками за допомогою сконструйованого глікозилювання", поданої 11 березня 2013 р., і попередньої заявки США № 61/776710, озаглавленої "Гіперглікозиловані зв'язувальні поліпептиди", поданої 11 березня 2013 р. Зміст вищевказаних заявок включений в даний опис як посилання в повному обсязі.

Відомий рівень техніки

Антитіла зі зниженим глікозилюванням Fc або відсутністю глікозилювання Fc використовували для лікування запальних і аутоімунних захворювань або порушень для того, щоб зменшити побічні ефекти або токсичність, пов'язані з небажаною ефекторною функцією (див., наприклад, Chan and Carter, Nat. Reviews Immunology, 2010). Проте, глікозилювання Fc-домену антитіла важливе для структури антитіла, стабільності і функції, і відсутність глікозилювання може привести до антитіл з погіршеними біофізичними властивостями. Відповідно, у даній галузі техніки існує потреба в конструюванні зв'язувальних білків зі зниженою ефекторною функцією, але які зберігають, однак, бажані властивості глікозилюваного Fc-домену.

Короткий виклад суті винаходу

У даному винаході в порівнянні з попереднім рівнем техніки пропонуються поліпшені зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла або гібриди) і необов'язково їх кон'югати з ліками, що включають домен Fc зі зміненим глікозилюванням і зниженою ефекторною функцією. В ілюстративних варіантах здійснення домен Fc включає залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298, відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300, відповідно до нумерації EU. У даному винаході пропонуються також нуклеїнові кислоти, кодуючі антигензв'язувальні поліпептиди, рекомбінантні експресійні вектори і клітини-хазяїни для одержання таких антигензв'язувальних поліпептидів. Пропонуються також способи застосування антигензв'язувальних поліпептидів, розкритих у даному документі, для лікування захворювання.

Автори винаходу несподівано знайшли, що зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла) за даним винаходом характеризуються зміненими профілями глікозилювання, що дає перевагу в тому, що вони анулюють зв'язування зв'язувального поліпептиду з рецепторами Fc γ , тим самим змінюючи ефекторну функцію зв'язувального поліпептиду при збереженні бажаних біофізичних властивостей, що надаються глікозилюванням. Крім того, сконструйований сайт N-зв'язаного глікозилювання в положенні амінокислоти 298 також може бути використаний як сайт для кон'югації ефекторних частин, таких як цитотоксичні ліки.

Відповідно, в одному аспекті в даному винаході пропонується виділений зв'язувальний поліпептид, що включає домен Fc зі зміненим глікозилюванням, у якому домен Fc включає залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298, відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300, відповідно до нумерації EU, і де зв'язувальний поліпептид виявляє знижену ефекторну функцію в результаті зазначеного зміненого глікозилювання. В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид додатково включає залишок аланіну в положенні амінокислоти 299, відповідно до нумерації EU. В іншому варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид додатково включає залишок глутаміну в положенні амінокислоти 297, відповідно до нумерації EU. В одному варіанті здійснення домен Fc являє собою домен Fc IgG1. В іншому варіанті здійснення домен Fc походить від людини.

В одному варіанті здійснення бічний ланцюг залишку аспарагіну зв'язаний з гліканом через β -глікозиламідні зв'язки. В іншому варіанті здійснення глікан являє собою 2-антенарний глікан. В іншому варіанті здійснення глікан являє собою природну глікоформу ссавців.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид має більш низьку афінність до рецептора Fc γ , ніж зв'язувальний поліпептид, що має нативний домен Fc. В одному варіанті здійснення рецептор Fc γ являє собою Fc γ R1 і/або Fc γ R1IIa. В іншому варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид має спорідненість до рецептора FcRn, подібну зі зв'язувальним поліпептидом, що має нативний домен Fc.

В іншому варіанті здійснення глікан включає реакційноздатну альдегідну групу. В іншому варіанті здійснення глікан включає окислений залишок сахариду, що включає реакційноздатну альдегідну групу. В іншому варіанті здійснення окислений залишок сахариду являє собою кінцеву сіалову кислоту або галактозу.

В іншому варіанті здійснення глікан зв'язаний з ефекторною частиною. В іншому варіанті здійснення ефекторна частина являє собою цитотоксин. В іншому варіанті здійснення цитотоксин вибраний із групи цитотоксинів, перерахованих у таблиці 1. В іншому варіанті здійснення ефекторна частина являє собою детектуючий агент. В іншому варіанті здійснення ефекторна частина зв'язана через оксимний або гідразонний зв'язок із залишком сахариду глікану. В іншому варіанті здійснення залишок сахариду являє собою кінцеву сіалову кислоту або залишок галактози глікану. В іншому варіанті здійснення ефекторна частина включає рН-чутливий лінкер, дисульфідний лінкер, чутливий до ферменту лінкер або іншу розщеплювану лінкерну частину. В іншому варіанті здійснення ефекторна частина включає лінкерну частину, вибрану з групи лінкерних частин, представлених у таблиці 2 або 14.

У визначених варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид являє собою антитіло або імуноадгезин.

В іншому аспекті в даному винаході пропонується виділений зв'язувальний поліпептид, що включає домен Fc, де домен Fc включає вільний залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298, відповідно до нумерації EU; і вільний залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300, відповідно до нумерації EU.

В іншому аспекті в даному винаході пропонується виділений зв'язувальний поліпептид, що включає домен Fc, де домен Fc включає модифікований залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298, відповідно до нумерації EU; і вільний залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300, відповідно до нумерації EU.

В іншому варіанті здійснення ефекторна частина зв'язана через бічний ланцюг модифікованого залишку аспарагіну з залишком сахариду глікану. В одному варіанті здійснення сахарид являє собою кінцеву сіалову кислоту або залишок галактози глікану. В одному варіанті здійснення ефекторна частина зв'язана через оксимний або гідразонний зв'язок із залишком сахариду глікану. В одному варіанті здійснення сахарид являє собою кінцеву сіалову кислоту або залишок галактози глікану. В іншому варіанті здійснення модифікований залишок аспарагіну зв'язаний з ефекторною частиною ліків з утворенням кон'югата антитіло-ліки (ADC).

В іншому аспекті композиція включає зв'язувальний поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт.

В іншому аспекті даний винахід стосується лікування потребуючого цього хворого, який включає введення ефективної кількості композиції відповідно до винаходу.

В іншому аспекті в даному винаході пропонується виділений поліпептид, кодуючий зв'язувальний поліпептид відповідно до винаходу. В іншому аспекті даний винахід стосується вектора, що включає поліпептид, або клітини-хазяїна, що включає поліпептид або вектор.

У ще одному аспекті в даному винаході пропонується спосіб одержання зв'язувального поліпептиду, який включає експресію поліпептиду або вектора в клітині.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 являє собою схематичну ілюстрацію синтезу кон'югата антитіло-ліки, де частина токсину зв'язана з залишком окисленої сіалової кислоти глікану антитіла з використанням оксимного зв'язку.

Фіг. 2 являє собою гель, забарвлений кумасі синім, що демонструє експресію й очищення мутантів глікозилування.

На фіг. 3 наведені результати експериментів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, використовуваного для оцінки зв'язування мутантних антитіл HEBE1 IgG проти $\alpha\beta$ TCR з рекомбінантним людським Fc γ R11a (V158 і F158).

На фіг. 4 наведені результати експериментів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, використовуваного для оцінки зв'язування мутантних антитіл HEBE1 IgG проти $\alpha\beta$ TCR з рекомбінантним людським Fc γ R1.

На фіг. 5 зображений профіль вивільнення цитокінів із PBMC для TNF α , GM-CSF, IFN γ і IL-10 у присутності мутантних антитіл проти $\alpha\beta$ TCR (2 день).

На фіг. 6 зображений профіль вивільнення цитокінів із PBMC для IL-6, IL-4 і IL-2 у присутності мутантних антитіл проти $\alpha\beta$ TCR (2 день).

На фіг. 7 зображений профіль вивільнення цитокінів із PBMC для TNF α , GM-CSF, IFN γ і IL-10 у присутності мутантних антитіл проти $\alpha\beta$ TCR (4 день).

На фіг. 8 зображений профіль вивільнення цитокінів із PBMC для IL-6, IL-4 і IL-2 у присутності мутантних антитіл проти $\alpha\beta$ TCR (4 день).

На фіг. 9 представлені результати експериментів по дослідженню рівня експресії мутантів 2C3 за допомогою вестерн-блотингу і поверхневого плазмонного резонансу.

На фіг. 10 показані результати експериментів по дослідженню глікозилування мутантів 2C3 до і після обробки PNG-азою F.

На фіг. 11 наведені результати експериментів по дослідженню за допомогою SDS-PAGE сайтів глікозилування мутантів 2C3, виділених з культури клітин.

На фіг. 12 представлені результати експериментів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, використовуваних для оцінки зв'язування модифікованого антитіла проти CD52 з рекомбінантним людським Fc γ R11a (V158). Антитіло проти CD52, що включає мутації S298N/Y300S у домені Fc, використовували для оцінки ефекторної функції модифікованої молекули. Зв'язування з пептидом CD52 (A), зв'язування з Fc γ R11a (Val158, B) і контрольне зв'язування з FcRn миші (C).

На фіг. 13 зображені результати експериментів по дослідженню за допомогою поверхневого плазмонного резонансу зв'язувальних властивостей Fc мутантів 2C3.

На фіг. 14 зображені результати експериментів по дослідженню за допомогою поверхневого плазмонного резонансу зв'язування модифікованого антитіла проти CD52 з обома Fc γ R11a (Val158) (як зазначено вище) і Fc γ R11a (Phe158). Антитіла проти CD52, що включають мутації S298N/Y300S у домені Fc, використовували для оцінки ефекторної функції зв'язування модифікованої молекули з Fc γ R11a (Val158, фіг. 14A) і Fc γ R11a (Phe158, фіг. 14B).

На фіг. 15 зображений аналіз зв'язування Clq з мутантом S298N/Y300S і контролем WT 2C3 (A) і результати аналізу ELISA, що підтверджують еквівалентне покриття ямок.

На фіг. 16 зображені результати експериментів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу по вимірюванню кінетики зв'язування мутантів 2C3 з пептидом 741 CD-52.

На фіг. 17 зображені результати експериментів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, що порівнюють афінність зв'язування антигену антитілом WT проти CD-52, 2C3 і гіперглікозилованим мутантом A114N.

На фіг. 18 наведені результати експериментів по характеристиці заряду за допомогою ізоелектричного фокусування і мас-спектрометрії для визначення вмісту гліканів у мутантах 2C3.

На фіг. 19 зображені результати по концентрації (Octet) і результати експериментів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, що порівнюють афінність зв'язування антигену антитілами WT проти CD-52, 2C3 і мутантними антитілами.

На фіг. 20 зображені результати експериментів за допомогою SDS-PAGE по визначенню вмісту гліканів у мутанті A114N проти TME1.

На фіг. 21 зображені результати, одержані за допомогою SDS-PAGE і хроматографічного аналізу з гідрофобною взаємодією, мутанта A114N проти Her2.

На фіг. 22 зображені результати експериментів за допомогою SDS-PAGE, що демонструють кон'югацію ПЕГ з мутантом A114N 2C3 через амінооксизв'язок.

На фіг. 23 зображені результати експериментів за допомогою PX-MC по визначенню вмісту гліканів у гіперглікозилованому мутанті A114N проти TME1.

На фіг. 24 зображені результати експериментів за допомогою PX-MC по визначенню вмісту гліканів в антитілі проти Her2 дикого типу і гіперглікозилованому мутанті A114N проти Her2.

На фіг. 25 зображений ілюстративний спосіб здійснення сайт-специфічної кон'югації антитіла відповідно до методів відповідно до винаходу.

На фіг. 26 зображений синтез ілюстративних ефекторних частин за винаходом: аміноокси-Cys-MC-VC-PABC-MMAE і аміноокси-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10.

На фіг. 27 представлена інформація з характеристики сіалізованого антитіла проти HER2.

На фіг. 28 представлена інформація з характеристики окисленого сіалізованого антитіла проти HER2.

На фіг. 29 представлені хроматограми гідрофобної взаємодії глікокон'югатів, одержаних із трьома різними сіалізованими антитілами з двома різними амінооксигрупами.

На фіг. 30 представлена хроматограма HIC глікозилованого мутантного кон'югата A114 з АО-MMAE проти Her2, одержаного з використанням хімічних методів GAM(+).

Фіг. 31 ілюструє порівняння ефективності *in vitro* глікокон'югата і тіолового кон'югата проти HER2.

Фіг. 32 ілюструє порівняння ефективності *in vitro* глікокон'югата і тіолового кон'югата B11 проти FAP.

На фіг. 33 показане порівняння ефективності *in vivo* глікокон'югатів і тіолових кон'югатів проти HER2 у моделі ксенотрансплантата пухлинних клітин Her2+.

На фіг. 34 зображені результати експериментів за допомогою PX-MC по визначенню вмісту гліканів мутантного антитіла проти $\alpha\beta$ TCR, що містить мутацію S298N/Y300S.

На фіг. 35 представлені результати експериментів за допомогою кругового дихроїзму по визначенню відносної термічної стабільності антитіла проти $\alpha\beta$ TCR дикого типу і мутантного антитіла проти $\alpha\beta$ TCR, що містить мутацію S298N/Y300S.

На фіг. 36 зображені результати аналізу впливу на клітинну проліферацію ADC, одержаного з антитіла проти HER, що несе гіперглікозилуючу мутацію A114N, і АО-ММАЕ.

Докладний опис

У даному винаході пропонуються зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла) і їх кон'югати з ліками, що включають домен Fc, де домен Fc включає залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298, відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300, відповідно до нумерації EU. У даному розкритті пропонуються також нуклеїнові кислоти, кодуєчі антигензв'язувальні поліпептиди, рекомбінантні експресійні вектори і клітини-хазяїни для одержання таких антигензв'язувальних поліпептидів. Пропонуються також способи застосування антигензв'язувальних поліпептидів, розкритих у даному документі, для лікування захворювання.

I. Визначення

При застосуванні в даному документі, термін "зв'язувальний поліпептид" або "поліпептид, що зв'язує," повинен стосуватися поліпептиду (наприклад, антитіла), що містить щонайменше один сайт зв'язування, відповідальний за селективне зв'язування з антигеном-мішенню, що представляє інтерес (наприклад, з антигеном людини). Приклади сайтів зв'язування включають варіабельний домен антитіла, лігандзв'язувальний сайт рецептора або сайт ліганду, що зв'язує рецептор. У деяких аспектах зв'язувальні поліпептиди відповідно до винаходу включають множину (наприклад, два, три, чотири або більше) сайтів зв'язування.

При застосуванні в даному документі, термін "природний залишок" повинен стосуватися амінокислотного залишку, який зустрічається в природі у визначеному положенні амінокислоти зв'язувального поліпептиду (наприклад, антитіла або його фрагмента) і який не модифікований, введений або змінений рукою людини. При застосуванні в даному документі, термін "змінений зв'язувальний поліпептид" або "модифікований зв'язувальний поліпептид" включає зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіло або його фрагмент), що включають щонайменше один неприродний мутантний амінокислотний залишок.

Термін "що специфічно зв'язує", використовуваний у даному документі, стосується здатності антитіла або його антигензв'язувального фрагмента зв'язуватися з антигеном з константою дисоціації (K_d) не більше ніж приблизно $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-8}M$, $1 \times 10^{-9}M$, $1 \times 10^{-10}M$, $1 \times 10^{-11}M$, $1 \times 10^{-12}M$ або менше, і/або зв'язуватися з антигеном з афінністю, яка щонайменше в два рази вище його спорідненості до неспецифічного антигену.

При застосуванні в даному документі, термін "антитіло" стосується таких структур (наприклад, інтактних молекул антитіл, фрагментів антитіл або їх варіантів), що мають значну відому специфічну імунореактивну активність відносно антигену, що представляє інтерес (наприклад, антигену, асоційованого з пухлиною). Антитіла й імуноглобуліни включають легкі і важкі ланцюги, з міжланцюжковим ковалентним зв'язком між ними або без нього. Основні структури імуноглобулінів у системах хребетних відносно добре вивчені.

Як буде обговорюватися більш докладно нижче, загальний термін "антитіло" включає п'ять різних класів антитіл, що можуть відрізнитися біохімічно. Усі п'ять класів антитіл, мабуть, включаються в обсяг даного опису, наступне обговорення, як правило, буде спрямоване на клас IgG молекул імуноглобулінів. Що стосується імуноглобулінів IgG, вони включають два ідентичні легкі ланцюги з молекулярною масою приблизно 23000 дальтон і два ідентичні важкі ланцюги з молекулярною масою 53000-70000 дальтон. Чотири ланцюги зв'язані дисульфідними зв'язками в конфігурації "Y", де легкі ланцюги облямовують важкі ланцюги, починаючи з устя "Y" і продовжуючи вздовж варіабельної області.

Легкі ланцюги імуноглобуліну класифікуються як або каппа, або лямбда (κ , λ). Кожен клас важкого ланцюга може бути зв'язаний або з легким ланцюгом каппа, або з легким ланцюгом лямбда. Загалом, легкі і важкі ланцюги ковалентно зв'язані один з одним, а частини "хвоста" двох важких ланцюгів зв'язані одна з одною за допомогою ковалентних дисульфідних зв'язків або нековалентних зв'язків, коли імуноглобуліни створюються або за допомогою гібридом, В-клітин, або за допомогою генетично сконструйованих клітин-хазяїнів. У важкому ланцюзі амінокислотні послідовності починаються з N-кінця у бік вилкоподібних кінців конфігурації Y до C-кінця від основи кожного ланцюга. Фахівцям у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що важкі ланцюги класифікуються як гамма-, мію-, альфа-, дельта- або епсилон- (γ , μ , α , δ , ϵ) з деякими підкласами між ними (наприклад, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа саме цього ланцюга визначає "клас" антитіла як IgG, IgM, IgA, IgG або IgE, відповідно. Підкласи ізотипів імуноглобулінів (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і т. д.) добре охарактеризовані і, як відомо, надають функціональну спеціалізацію. Модифіковані варіанти кожного з цих класів і ізотипів легко розрізняються фахівцем у даній галузі з урахуванням даного опису і, відповідно, входять в обсяг даного розкриття.

Обидва легкі і важкі ланцюги розділені на області структурної і функціональної гомології. Термін "область" стосується частини або порції ланцюга імуноглобуліну або антитіла і включає константну область або варіабельні області, а також більш дискретні частини або частини зазначених областей. Наприклад, варіабельні області легкого ланцюга включають "області, що визначають комплементарність," або "CDR", розподілені серед "каркасних областей" або "FR", як визначено в даному документі.

Області важкого або легкого ланцюга імуноглобуліну можуть бути визначені як "константна" область (C) або "варіабельна" область (V) на основі відносної відсутності варіацій послідовності в областях у членів різних класів у випадку "константної області" або значної варіації в областях у членів різних класів у випадку "варіабельних областей". Терміни "константна область" і "варіабельна область" можуть бути також використані функціонально. У зв'язку з цим, варто розуміти, що варіабельні області імуноглобуліну або антитіла визначають упізнавання антигену і специфічність. З іншого боку, константні області імуноглобуліну або антитіла додають важливі ефекторні функції, такі як секреція, проникність через плаценту, зв'язування рецептора Fc, зв'язування комплементу тощо. Структури субодиниць і тривимірні конфігурації константних областей різних класів імуноглобулінів добре відомі.

Константні і варіабельні області важких і легких ланцюгів імуноглобулінів укладаються у вигляді доменів. Термін "домен" стосується глобулярної області важкого або легкого ланцюга, що включає пептидні петлі (наприклад, що включає від 3 до 4 пептидних петель), стабілізовані, наприклад, β -складчастою конформацією і/або внутрішньоланцюжковим дисульфідним зв'язком. Домени константної області легкого ланцюга імуноглобуліну позначаються взаємозамінно як "домени константної області легкого ланцюга", "області CL" або "домени CL". Константні домени важкого ланцюга (наприклад, шарнір, домени CH1, CH2 або CH3) позначають взаємозамінно як "константні домени області важкого ланцюга", домени області "CH" або "домени CH". Варіабельні домени легкого ланцюга позначають взаємозамінно як "варіабельні домени області легкого ланцюга", "домени VL-області" або "домени VL". Варіабельні домени важкого ланцюга позначають взаємозамінно як "варіабельні домени області важкого ланцюга", "домени VH-області" або "домени VH".

Традиційно нумерація варіабельних доменів константної області зростає у міру того, як вони розташовуються дистальніше антигензв'язувального сайту або амінокінця імуноглобуліну або антитіла. N-кінець кожного важкого і легкого ланцюга імуноглобуліну являє собою варіабельну область, і C-кінець являє собою константну область; домени CH3 і CL у дійсності включають карбоксильний кінець важкого і легкого ланцюга, відповідно. Відповідно, домени легкого ланцюга імуноглобуліну організовані в орієнтації VL-CL, у той час як домени важкого ланцюга організовані в орієнтації VH-CH1-шарнір-CH2-CH3.

Положення амінокислот у константній області важкого ланцюга, включаючи положення амінокислот у CH1, шарнірі, CH2, CH3, і в домені CL можуть бути пронумеровані відповідно до системи нумерації по індексу Кебата (див. Kabat et al., у "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991). Альтернативно, положення амінокислот антитіла можуть бути пронумеровані відповідно до системи нумерації по індексу EU (див. Kabat et al., там же).

При застосуванні в даному документі, термін "домен VH" включає амінокінцевий варіабельний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, і термін "домен VL" включає амінокінцевий варіабельний домен легкого ланцюга імуноглобуліну.

При застосуванні в даному документі, термін "домен CH1" включає перший (найбільш амінокінцевий) домен константної області важкого ланцюга імуноглобуліну, що простягається, наприклад, приблизно від положень 114-223 у системі нумерації Кебата (від положень 118-215 по EU). Домен CH1 примикає до домену VH і амінокінця шарнірної області важкого ланцюга молекули імуноглобуліну і не утворює частини області Fc важкого ланцюга імуноглобуліну.

При застосуванні в даному документі, термін "шарнірна область" включає частину молекули важкого ланцюга, що з'єднує домен CH1 з доменом CH2. Ця шарнірна область включає приблизно 25 залишків і є гнучкою, що дозволяє двом N-кінцевим антигензв'язувальним областям змінювати положення незалежно одна від одної. Шарнірні області можна підрозділити на три різних домени: верхній, середній і нижній шарнірні домени (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161:4083).

При застосуванні в даному документі, термін "домен CH2" включає частину важкого ланцюга молекули імуноглобуліну, що тягнеться, наприклад, приблизно від положень 244-360 у системі нумерації по Кебату (положення 231-340 по EU). Домен CH2 є унікальним у тому розумінні, що він не тісно спарений з іншим доменом. Скоріше, два N-зв'язані розгалужені вуглеводні ланцюги розміщені між двома доменами CH2 інтактної природної молекули IgG. В одному варіанті

здійснення зв'язувальний поліпептид за даним розкриттям включає домен CH2, що походить від молекули IgG1 (наприклад, молекули IgG1 людини).

При застосуванні в даному документі, термін "домен CH3" включає частину важкого ланцюга молекули імуноглобуліну, що тягнеться приблизно на 110 залишків від N-кінця домену CH2, наприклад, приблизно від положень 361-476 у системі нумерації по Кебату (положення 341-445 по EU). Домен CH3, як правило, утворює C-кінцеву частину антитіла. У деяких імуноглобулінах, однак, додаткові домени можуть розташовуватися за областю CH3 з утворенням C-кінцевої частини молекули (наприклад, домен CH4 у μ -ланцюзі IgM і ε -ланцюзі IgE). В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид за даним розкриттям включає домен CH3, що походить від молекули IgG1 (наприклад, молекули IgG1 людини).

При застосуванні в даному документі, термін "домен CL" включає домен константної області легкого ланцюга імуноглобуліну, що розташований, наприклад, приблизно в положенні 107A-216 по Кебату. Домен CL примикає до домену VL. В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид за даним розкриттям включає домен CL, що походить від легкого каппа-ланцюга (наприклад, легкого каппа-ланцюга людини).

При застосуванні в даному документі, термін "область Fc" визначається як частина константної області важкого ланцюга, що починається в шарнірній області безпосередньо перед сайтом розщеплення папаїном (тобто залишком 216 у IgG, причому перший залишок константної області важкого ланцюга буде в положенні 114) і закінчується на C-кінці антитіла. Відповідно, повна область Fc включає щонайменше шарнірну область, домен CH2 і домен CH3.

Термін "нативний Fc", використовуваний у даному документі, стосується молекули, яка включає послідовність фрагмента, що не зв'язує антиген, виникає в результаті гідролізу антитіла або одержана за допомогою інших способів, як у мономерній, так і в мультимерній формі, і вона може включати шарнірну область. Вихідне джерело імуноглобуліну для нативного Fc переважно являє собою імуноглобулін людського походження і може бути будь-яким імуноглобуліном, хоча переважні IgG1 і IgG2. Нативні молекули Fc побудовані з мономерних поліпептидів, що можуть бути з'єднані в димерні або мультимерні форми за допомогою ковалентних (тобто дисульфідних зв'язків) і нековалентних зв'язків. Кількість міжмолекулярних дисульфідних зв'язків між мономерними субодинамиціями нативних молекул Fc знаходиться в діапазоні від 1 до 4 залежно від класу (наприклад, IgG, IgA і IgE) або підкласу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 і IgA2). Одним із прикладів нативного Fc є зв'язаний дисульфідним містком димер, що виникає в результаті розщеплення папаїном IgG. Термін "нативний Fc", використовуваний у даному документі, є загальним для мономерних, димерних і мультимерних форм.

Термін "варіант Fc", використовуваний у даному документі, стосується молекули або послідовності, яка модифікована відносно нативного Fc, але усе ще включає сайт зв'язування для рецептора реутилізації, FcRn (неонатального рецептора Fc). Ілюстративні варіанти Fc, а також їх взаємодія з рецептором реутилізації відомі в даній галузі техніки. Таким чином, термін "варіант Fc" може включати молекулу або послідовність, яка гуманізована відносно нативного Fc, що походить не від людини. Крім того, нативний Fc включає області, що можуть бути видалені, оскільки вони забезпечують структурними особливостями або біологічною активністю, які не вимагаються для антитілоподібних зв'язувальних поліпептидів за винаходом. Таким чином, термін "варіант Fc" включає молекулу або послідовність, у якій відсутній один або більше з нативних сайтів або залишків Fc або в якій модифіковані один або більше сайтів або залишків Fc, що впливають або залучені в: (1) утворення дисульфідних зв'язків, (2) несумісність з вибраною клітиною-хазяїном, (3) N-кінцеву гетерогенність при експресії в вибраній клітині-хазяїні, (4) глікозилування, (5) взаємодію з комплементом, (6) зв'язування з рецептором Fc, крім рецептора реутилізації, або (7) залежну від антитіл клітинну цитотоксичність (ADCC).

Термін "домен Fc", використовуваний у даному документі, охоплює нативні Fc і варіанти і послідовності Fc, як визначено вище. Як у варіантах Fc, так і в нативних молекулах Fc, термін "домен Fc" включає молекули в мономерній або мультимерній формі, будь то молекули, одержані в результаті гідролізу цілого антитіла або одержані за допомогою інших способів.

Як зазначено вище, варіабельні області антитіла дозволяють йому вибірково упізнавати і специфічно зв'язувати епітопи на антигенах. Це значить, що домен VL і домен VH антитіла об'єднуються з утворенням варіабельної області (Fv), яка визначає тривимірний сайт зв'язування антигену. Ця четвертинна структура антитіла утворює антигензв'язувальний сайт, присутній на кінці кожного плеча Y. Більш конкретно, антигензв'язувальний сайт визначається трьома гіперваріабельними областями (CDR) на кожній з варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів. При застосуванні в даному документі, термін "антигензв'язувальний сайт" включає сайт, що специфічно зв'язується (імуновзаємодіє) з антигеном (наприклад, антигеном

клітинної поверхні або розчинним антигеном). Антигензв'язувальний сайт включає варіабельну область важкого ланцюга і легкого ланцюга імуноглобуліну, і сайт зв'язування, утворений цими варіабельними областями, визначає специфічність антитіла. Антигензв'язувальний сайт утворюється варіабельними областями, що варіюються від одного антитіла до іншого.

5 Модифіковані антитіла за даним розкриттям включають щонайменше один антигензв'язувальний сайт.

У визначених варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям включають щонайменше два антигензв'язувальних домени, які забезпечують зв'язування зв'язувального поліпептиду з вибраним антигеном. Антигензв'язувальні домени не повинні походити з однієї і тієї ж молекули імуноглобуліну. У зв'язку з цим варіабельна область може походити або походить від будь-якого виду тварини, якщо може бути індукований ріст гуморальної відповіді і вироблення імуноглобулінів проти бажаного антигену. У такому випадку варіабельна область зв'язувального поліпептиду може походити, наприклад, від ссавців, наприклад може походити від людини, миші, щура, кози, вівці, примата, що не є людиною (наприклад, яванських макак, звичайних макак і т. д.), вовчих або верблюдячих (наприклад, від верблюдів, лам і споріднених видів).

У природних антитілах шість CDR, присутніх на кожному мономерному антитілі, являють собою короткі, несуміжні амінокислотні послідовності, що розташовані специфічно для формування антигензв'язувального сайту, коли антитіло приймає свою тривимірну конфігурацію у водному середовищі. Варіабельні домени, що залишилися, важких і легких ланцюгів виявляють меншу міжмолекулярну варіабельність амінокислотної послідовності і називаються каркасними областями. Каркасні області значною мірою приймають β -складчасту конформацію і CDR утворюють петлі, що з'єднують β -складчасту структуру й у деяких випадках утворюють її частину. Таким чином, ці каркасні області служать для формування каркаса, що забезпечує розташування шести CDR у правильній орієнтації за допомогою міжланцюжкових, нековалентних взаємодій. Антигензв'язувальний домен, утворений правильно розташованими CDR, визначає поверхню, комплементарну епітопу на імунореактивному антигені. Ця комплементарна поверхня сприяє нековалентному зв'язуванню антитіла з імунореактивним епітопом антигену.

Приклади зв'язувальних поліпептидів за винаходом включають варіанти антитіл. При застосуванні в даному документі, термін "варіант антитіла" включає синтетичні і сконструйовані форми антитіл, які змінені таким чином, що вони не зустрічаються в природі, наприклад форми антитіл, що включають щонайменше дві частини важких ланцюгів, але не два повні важкі ланцюги (такі як антитіла з делецією домену або міні-тіла); мультиспецифічні форми антитіл (наприклад, біспецифічні, триспецифічні і т. д.), змінені для зв'язування з двома або більше різними антигенами або з різними епітопами на одному антигені); молекули важких ланцюгів, з'єднані з молекулами scFv тощо. Крім того, термін "варіант антитіла" включає мультивалентні форми антитіл (наприклад, тривалентні, чотиривалентні і т. д. антитіла), що зв'язуються з трьома, чотирма або більше копіями одного і того ж антигену.

Використовуваний у даному описі термін "валентність" стосується числа потенційних сайтів, що зв'язують мішень, у поліпептиді. Кожен сайт, що зв'язує мішень, специфічно зв'язує одну мішень або специфічний сайт на молекулі-мішені. Коли поліпептид включає більше одного сайту, що зв'язує мішень, кожен сайт, що зв'язує мішень, може специфічно зв'язуватися з однаковими або різними молекулами (наприклад, може зв'язуватися з різними лігандами або з різними антигенами, або з різними епітопами на одному і тому ж антигені). Зв'язувальні поліпептиди, що розглядаються, переважно мають щонайменше один сайт зв'язування, специфічний для молекули антигену людини.

Термін "специфічність" стосується здатності специфічно зв'язувати (наприклад, імуновзаємодіяти з) даний антиген-мішень (наприклад, антиген-мішень людини). Зв'язувальний поліпептид може бути моноспецифічним і включає один або більше сайтів зв'язування, що специфічно зв'язують мішень, або поліпептид може бути мультиспецифічним і включає два або більше сайтів зв'язування, що специфічно зв'язують одні і ті ж або різні мішені. У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид за винаходом є специфічним для двох різних (наприклад, що не перекриваються) ділянок однієї і тієї ж мішені. У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид за винаходом є специфічним для більше ніж однієї мішені. Приклади зв'язувальних поліпептидів (наприклад, антитіл), що включають антигензв'язувальні сайти, які зв'язуються з антигенами, експресованими на пухлинних клітинах, відомі в даній галузі техніки, і одна або більше CDR від таких антитіл можуть бути включені в антитіло відповідно до винаходу.

Термін "лінкерна частина" включає частини, що здатні з'єднувати ефекторну частину зі зв'язувальними поліпептидами, розкритими в даному документі. Лінкерна частина може бути вибрана таким чином, щоб вона була розщеплюваною (наприклад, ферментативно розщеплюваною або чутливою до рН) або нерозщеплюваною. Приклади лінкерних частин

5 представлені в даному документі в таблиці 2.

При застосуванні в даному документі, термін "ефекторна частина" включає діагностичні і терапевтичні агенти (наприклад, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, частини ліків і їх фрагменти) з біологічною або іншою функціональною активністю. Наприклад, модифікований зв'язувальний поліпептид, що включає ефекторну частину, кон'юговану зі зв'язувальним поліпептидом, має щонайменше одну додаткову функцію або властивість у порівнянні з некон'югованим антитілом. Наприклад, кон'югація цитотоксичних ліків (наприклад, ефекторної частини) зі зв'язувальним поліпептидом приводить до утворення зв'язувального поліпептиду з лікарською цитотоксичністю як другою функцією (тобто на доповнення до зв'язування антигену). В іншому прикладі кон'югація другого зв'язувального поліпептиду зі зв'язувальним поліпептидом може надати додаткові зв'язувальні властивості. У деяких варіантах здійснення, коли ефекторна частина являє собою кодований генетично терапевтичний або діагностичний білок або нуклеїнову кислоту, ефекторна частина може бути синтезована або експресована або за допомогою пептидного синтезу, або шляхом методів рекомбінантних ДНК, що добре відомі в даній галузі техніки. В іншому аспекті, коли ефекторна частина не є генетично кодованим пептидом або частиною ліків, ефекторна частина може бути синтезована штучно або очищена з природного джерела. При застосуванні в даному документі, термін "частина ліків" включає протизапальні, протипухлинні, антиінфекційні (наприклад, протигрибкові, антибактеріальні, протипаразитарні, противірусні і т. д.) і анестезуючі терапевтичні агенти. В іншому варіанті здійснення частина ліків являє собою протираковий або цитотоксичний агент. Сумісні частини ліків можуть також включати проліки. Приклади ефекторних частин представлені в даному документі в таблиці 1.

При застосуванні в даному документі, термін "проліки" стосується попередника або похідної форми фармацевтично активного агента, що є менш активними, реакційноздатними або схильними до побічних ефектів у порівнянні з батьківськими ліками і здатні ферментативно активуватися або іншим способом перетворюватися в більш активну форму *in vivo*. Проліки, сумісні з композиціями за даним винаходом, включають, але не обмежуються цим, проліки, що включають фосфат, проліки, що включають амінокислоти, проліки, що включають тіофосфат, проліки, що включають сульфат, проліки, що включають пептид, проліки, що включають β -лактам, проліки, що включають необов'язково заміщений феноксиацетамід, або проліки, що включають необов'язково заміщений фенілацетамід, 5-фторцитозин і інші проліки з 5-фторуридином, які можуть бути перетворені в більш активні цитотоксичні вільні ліки. Фахівець у даній галузі техніки може створити хімічні модифікації в бажаній частині ліків або їх проліків для того, щоб зробити реакції цієї сполуки більш зручними відносно одержання модифікованих зв'язувальних поліпептидів за даним розкриттям. Частини ліків включають також похідні сполуки, фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри, аміди і прості ефіри частин ліків, описані в даному документі. Похідні сполуки включають модифікації ліків, ідентифікованих у даному документі, що можуть поліпшити або несуттєво знизити бажану терапевтичну активність конкретних ліків.

При застосуванні в даному документі, термін "протираковий агент" включає агенти, які є шкідливими для росту і/або проліферації пухлинних або ракових клітин і можуть діяти для зменшення, інгібування або знищення злорякисного росту. Приклади таких агентів включають, але не обмежуються цим, цитостатики, алкілувальні агенти, антибіотики, цитотоксичні нуклеозиди, агенти, що зв'язують тубулін, гормони, антагоністи гормонів, цитотоксичні агенти тощо. Цитотоксичні агенти включають томаїміцин, похідні майтанзину, похідні криптофіцину, похідні антрацикліну, похідні бісфосфонатів, похідні лептоміцину, похідні стрептонігріну, похідні ауристатину і похідні дуокарміцину. Будь-який агент, що діє для затримки або уповільнення росту імунореактивних клітин або злорякисних клітин, входить в обсяг даного розкриття.

Термін "антиген" або "антиген-мішень", використовуваний у даному документі, стосується молекули або частини молекули, що здатна зв'язуватися зі зв'язувальним сайтом зв'язувального поліпептиду. Антиген-мішень може мати один або декілька епітопів.

II. Зв'язувальні поліпептиди

В одному аспекті в даному винаході пропонуються зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла, фрагменти антитіл, варіанти антитіл і гібридних білків), що включають домен Fc, де домен Fc включає залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298, відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300, відповідно до нумерації EU.

У зв'язувальних поліпептидах, розкритих у даному документі, можуть бути використані домени Fc будь-якого класу імуноглобулінів (наприклад, IgM, IgG, IgD, IgA і IgE) і будь-яких видів. Також можуть бути використані химерні домени Fc, що включають фрагменти доменів Fc від різних видів або класів Ig. У визначених варіантах здійснення домен Fc являє собою домен Fc IgG1 людини. У випадку домену Fc IgG1 людини мутації амінокислоти дикого типу в положенні 298 по Кебату з заміною на аспарагін і в положенні 300 по Кебату з заміною на серин або треонін приводять до утворення консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилування (тобто сиквона N-X-T/S, де X позначає будь-яку амінокислоту, крім проліну). Однак у випадку доменів Fc інших видів і/або класів або ізотипів Ig фахівець у даній галузі повинен розуміти, що для відтворення сиквона N-X-T/S може виникнути необхідність мутації домену Fc у положенні 299 по Кебату, якщо є присутнім залишок проліну.

Зв'язувальні поліпептиди, розкриті в даному документі, охоплюють будь-який зв'язувальний поліпептид, який включає домен Fc, що має N-зв'язаний сайт глікозилування в положенні 298, відповідно до нумерації по Кебату. У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид являє собою антитіло або його фрагмент, або його похідне. Будь-яке антитіло з будь-якого джерела або виду може бути використане в зв'язувальних поліпептидах, розкритих у даному документі. Придатні антитіла включають без обмеження антитіла людини, гуманізовані антитіла або химерні антитіла.

У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид за даним розкриттям може включати антигензв'язувальний фрагмент антитіла. Термін "антигензв'язувальний фрагмент" стосується поліпептидного фрагмента імуноглобуліну або антитіла, що зв'язує антиген або конкурує з інтактним антитілом (тобто з інтактним антитілом, з якого він походить) за зв'язування антигену (тобто за специфічне зв'язування). Антигензв'язувальні фрагменти можуть бути одержані за допомогою рекомбінантних або біохімічних методів, що добре відомі в даній галузі техніки. Ілюстративні антигензв'язувальні фрагменти включають Fv, Fab, Fab' і (Fab')₂. У переважних варіантах здійснення антигензв'язувальний фрагмент за даним винаходом являє собою змінений антигензв'язувальний фрагмент, що включає щонайменше один сконструйований сайт глікозилування. В одному ілюстративному варіанті здійснення змінений антигензв'язувальний фрагмент за даним розкриттям включає змінений домен VH, описаний вище. В іншому ілюстративному варіанті здійснення змінений антигензв'язувальний фрагмент за даним розкриттям включає змінений домен CH1, описаний вище.

В ілюстративних варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид включає одноланцюжкову послідовність варіабельної області (ScFv). Одноланцюжкові послідовності варіабельної області включають одиночний поліпептид, що має один або більше сайтів зв'язування антигену, наприклад домен VL, зв'язаний за допомогою гнучкого лінкера з доменом VH. Молекули ScFv можуть бути сконструйовані в орієнтації VH-лінкер-VL або в орієнтації VL-лінкер-VH. Гнучкий шарнір, що зв'язує домени VL і VH, які складають антигензв'язувальний сайт, переважно включає від приблизно 10 до приблизно 50 амінокислотних залишків. З'єднуючі пептиди відомі в даній галузі техніки. Зв'язувальний поліпептид за винаходом може включати щонайменше одну ScFv і/або щонайменше одну константну область. В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид за даним винаходом може включати щонайменше одну ScFv, зв'язану або з'єднану з антитілом або фрагментом, що включає домен CH1 (наприклад, домен CH1, що включає залишок аспарагіну в положенні 114 по Кебату) і/або домен CH2 (наприклад, домен CH2, що включає залишок аспарагіну в положенні 298 по EU і серин або треонін у положенні 300 по EU).

У деяких ілюстративних варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид за даним винаходом є полівалентним (наприклад, чотиривалентним) антитілом, яке одержують за допомогою з'єднання послідовності ДНК, кодуєчої антитіло, з молекулою ScFv (наприклад, зміненою молекулою ScFv). Наприклад, в одному варіанті здійснення ці послідовності об'єднують таким чином, що молекулу ScFv (наприклад, змінену молекулу ScFv) з'єднують на її N-кінці або C-кінці з фрагментом Fc антитіла через гнучкий лінкер (наприклад, лінкер Gly/Ser). В іншому варіанті здійснення чотиривалентне антитіло за даним винаходом може бути одержане шляхом з'єднання молекули ScFv із з'єднуючим пептидом, що з'єднаний з доменом CH1 (наприклад, з доменом CH1, що включає залишок аспарагіну в положенні 114 по Кебату), для конструювання чотиривалентної молекули ScFv-Fab.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид за даним винаходом являє собою змінене міні-тіло. Змінені міні-тіла за даним розкриттям являють собою димерні молекули, одержані з двох поліпептидних ланцюгів, причому кожний з яких включає молекулу ScFv (наприклад, змінену молекулу ScFv, що включає змінений домен VH, описаний вище), що з'єднані з доменом CH3 або його частиною через з'єднуючий пептид. Міні-тіла можуть бути одержані шляхом конструювання компонента ScFv і компонента з'єднуючий пептид-CH3 за

допомогою методів, описаних у даній галузі техніки (див., наприклад, патент США № 5837821 або WO 94/09817A1). В іншому варіанті здійснення може бути сконструйоване чотиривалентне міні-тіло. Чотиривалентні міні-тіла можуть бути сконструйовані таким же чином, як міні-тіла, за винятком того, що дві молекули scFv з'єднують за допомогою гнучкого лінкера. Зв'язаний конструктор scFv-scFv потім з'єднують з доменом CH3.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид за даним розкриттям включає діатіло. Діатіла являють собою димерні, чотиривалентні молекули, кожна з яких включає поліпептид, подібний з молекулами scFv, але звичайно має короткі лінкери з (менше 10, а переважно 1-5) амінокислотних залишків, що з'єднують обидва варіабельних домени, так, що домени VL і VH на одному і тому ж поліпептидному ланцюзі не можуть взаємодіяти. Замість цього, домен VL і VH одного поліпептидного ланцюга взаємодіє з доменом VH і VL (відповідно) на другому поліпептидному ланцюзі (див., наприклад, WO 02/02781). Діатіла за даним розкриттям включають молекулу scFv, з'єднану з доменом CH3.

В інших варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди відповідно до винаходу включають мультиспецифічні або полівалентні антитіла, що включають один або більше варіабельних доменів у ряді одного і того ж поліпептидного ланцюга, наприклад, поліпептиди з тандемними варіабельними доменами (TVD). Ілюстративні поліпептиди TVD включають конфігурацію "подвійної головки" або "подвійного Fv", описану в патенті США № 5989830. У конфігурації подвійного Fv варіабельні домени двох різних антитіл експресують у тандемній орієнтації на двох окремих ланцюгах (одного важкого ланцюга й одного легкого ланцюга), де один поліпептидний ланцюг має в ряді два повторення VH, розділених пептидним лінкером (VH1-лінкер-VH2), а інший поліпептидний ланцюг складається з комплементарних доменів VL, з'єднаних у ряді пептидним лінкером (VL1-лінкер-VL2). У конфігурації перехресної подвійної головки варіабельні домени двох різних антитіл експресують у тандемній орієнтації на двох окремих поліпептидних ланцюгах (одного важкого ланцюга й одного легкого ланцюга), де один поліпептидний ланцюг має в ряді два VH, розділені пептидним лінкером (VH1-лінкер-VH2), а інший поліпептидний ланцюг складається з комплементарних доменів VL, з'єднаних у ряді пептидним лінкером у протилежній орієнтації (VL2-лінкер-VL1). Додаткові варіанти антитіл на основі формату "подвійного Fv" включають біспецифічне антитіло з подвійним варіабельним доменом IgG (DVD-IgG) (див. патент США № 7612181) і формат TBTI (див. патент США № 2010/0226923 A1). Додавання константних доменів до відповідних ланцюгів подвійного Fv (CH1-Fc до важкого ланцюга і каппа або лямбда константного домену до легкого ланцюга) приводить до функціональних біспецифічних антитіл без якої-небудь необхідності в додаткових модифікаціях (тобто загальновідоме додавання константних доменів для підвищення стабільності).

В іншому ілюстративному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид включає біспецифічне антитіло з перехресним подвійним варіабельним доменом IgG (CODV-IgG) на основі конфігурації "подвійної головки" (див. патент US № 20120251541 A1, що включений у даний опис як посилання в повному обсязі). Варіанти антитіл CODV-IgG мають один поліпептидний ланцюг з доменами VL, з'єднаними в ряді з доменом CL (VL1-L1-VL2-L2-CL), і другий поліпептидний ланцюг з комплементарними доменами VH, з'єднаними в ряді в протилежній орієнтації з доменом CH1 (VH2-L3-VH1-L4-CH1), де поліпептидні ланцюги утворюють перехресну пару легкий ланцюг-важкий ланцюг. У визначеному варіанті здійснення другий поліпептид може бути додатково з'єднаний з доменом Fc (VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). У деяких варіантах здійснення лінкер L3 щонайменше в два рази довше лінкера L1 і/або лінкер L4 щонайменше в два рази довше лінкера L2. Наприклад, L1 і L2 можуть складати 1-3 амінокислотних залишки в довжину, L3 може складати від 2 до 6 амінокислотних залишків у довжину, і L4 може складати від 4 до 7 амінокислотних залишків у довжину. Приклади придатних лінкерів включають один залишок гліцину (Gly); дигліциновий пептид (Gly-Gly); трипептид (Gly-Gly-Gly); пептид з чотирма залишками гліцину (Gly-Gly-Gly-Gly); пептид з п'ятьма залишками гліцину (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид із шістьма залишками гліцину (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид з сімома залишками гліцину (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид з вісьма залишками гліцину (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Можуть бути використані інші сполучення амінокислотних залишків, такі як пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser і пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser.

У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид включає молекулу імуноадгезину, що включає зв'язувальну область не від антитіла (наприклад, молекулу рецептора, ліганду або клітинної адгезії), з'єднану з константною областю антитіла (див., наприклад, статтю Ashkenazi et al., Methods, 1995 8(2), 104-115, включену в даний опис як посилання в повному обсязі).

У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид включає імуноглобуліноподібні домени. Придатні імуноглобуліноподібні домени включають без обмеження домени фібрoneктину (див., наприклад, статтю Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352:95-109, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), DARPIn (див., наприклад, статтю Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16):695-701, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), домени Z білка A (див. статтю Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11):2668-76, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), ліпокаліни (див., наприклад, статтю Skerra et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11):2677-83, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), афіліни (див., наприклад, статтю Ebersbach et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1):172-85, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), афітини (див., наприклад, статтю Krehenbrink et al. (2008). *J. Mol. Biol.* 383 (5):1058-68, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), авімери (див., наприклад, статтю Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12):1556-61, включену в даний опис як посилання в повному обсязі), фіномери (див., наприклад, статтю Grabulovski et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282 (5):3196-3204, включену в даний опис як посилання в повному обсязі) і пептиди домену Kunitz (див., наприклад, статтю Nixon et al. (2006) *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 9 (2):261-8, включену в даний опис як посилання в повному обсязі).

III. N-зв'язані глікани

У визначених варіантах здійснення домен Fc зв'язувальних поліпептидів, описаних у даному документі, глікозилований у положенні 298 сконструйованого аргініну (N298), відповідно до нумерації EU. N-зв'язаний глікан звичайно зв'язаний через β -глікозиламідний зв'язок з групою азоту бічного ланцюга N298. Однак можуть бути використані також інші придатні відомі в даній галузі техніки зв'язки.

Будь-який тип природного або синтетичного (тобто неприродного) N-зв'язаного глікану може бути з'єднаний з N114. Наприклад, глікан може являти собою природний глікан або сконструйований глікан, що містить неприродні зв'язки. У деяких варіантах здійснення глікан включає сахарид, що може бути окисленим (наприклад, шляхом обробки перйодатом), з одержанням групи, придатної для кон'югації з ефекторною частиною молекули (наприклад, реактивної альдегідної групи). Придатні окислювані сахариди включають без обмеження галактозу і сіалову кислоту (наприклад, N-ацетилнейрамінову кислоту). У деяких варіантах здійснення глікан являє собою 2-антенарний глікан. У деяких варіантах здійснення глікан являє собою природну глікоформу ссавців.

Глікозилювання може бути досягнуте за допомогою будь-яких способів, відомих у даній галузі техніки. У деяких варіантах здійснення глікозилювання досягається шляхом експресії зв'язувальних поліпептидів у клітинах, здатних до N-зв'язаного глікозилювання. Може бути використана будь-яка природна або сконструйована клітина (наприклад, прокариотична або еукаріотична). У цілому для здійснення глікозилювання використовуються клітини ссавців. N-глікани, які продукуються в клітинах ссавців, звичайно називають складними N-гліканами (див., наприклад, книгу Drickamer K., Taylor ME (2006). *Introduction to Glycobiology*, 2nd ed., включену в даний опис як посилання в повному обсязі). Ці складні N-глікани мають структуру з зовнішніми гілками звичайно в кількості від двох до шести з послідовністю сіаліллактозаміну, зв'язаною з внутрішньою структурою каркаса Man₃GlcNAc₂. Складний N-глікан має щонайменше одну гілку і переважно щонайменше дві гілки з почергових залишків GlcNAc і галактози (Gal), що є кінцевими в олігосахаридах, такі як, наприклад: NeuNAc-; NeuAc α 2,6 GalNAc α 1; NeuAc α 2,3 Gal β 1,3 GalNAc α 1; і NeuAc α 2,3/6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1. Крім того, у галактозі можуть існувати сульфатні ефіри, залишки GalNAc і GlcNAc, і складні ефіри фосфорної кислоти можуть існувати в залишках манози. NeuAc може бути O-ацетильованим або заміненним на NeuGI (N-гліколілнейрамінову кислоту). Складні N-глікани можуть також мати внутрішньоланцюжкові заміни розгалуженого GlcNAc і фукози каркаса (Fuc).

Додатково або альтернативно глікозилювання може бути досягнуте або модифіковане за допомогою ферментативних способів *in vitro*. Наприклад, може бути використана одна або більше глікозилтрансфераз для додавання визначених сахаридних залишків до N298, і одна або більше глюкозидаз можуть бути використані для видалення небажаних сахаридів з N-зв'язаного глікану. Такі ферментативні способи добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, WO/2007/005786, що включена у даний документ як посилання в повному обсязі).

IV. Імунологічні ефекторні функції і модифікації Fc

У деяких варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди відповідно до винаходу можуть включати константну область антитіла (наприклад, константну область IgG, наприклад константну область IgG людини, наприклад константну область IgG1 або IgG4 людини), яка опосередковує одну або більше ефекторних функцій. Наприклад, зв'язування компонента C1

комплементу з константною областю антитіла може активувати систему комплементу. Активація комплементу відіграє важливу роль в опсонізації і лізисі клітинних патогенів. Активація комплементу також стимулює запальну реакцію, а також може бути залучена в аутоімунну гіперчутливість. Крім того, антитіла зв'язуються з рецепторами на різних клітинах через область Fc, причому рецепторний сайт зв'язування Fc в області Fc антитіла зв'язується з рецептором Fc (FcR) на клітині. Існує цілий ряд рецепторів Fc, що специфічні для різних класів антитіл, включаючи IgG (гамма-рецептори), IgE (епсилон-рецептори), IgA (альфа-рецептори) і IgM (мю-рецептори). Зв'язування антитіла з рецепторами Fc на клітинній поверхні викликає ряд важливих і різноманітних біологічних реакцій, включаючи поглинання і руйнування частинок, покритих антитілами, кліренс імунних комплексів, лізис покритих антитілами клітин-мішеней за допомогою клітин-кілерів (так називана залежна від антитіл опосередковувана клітинами цитотоксичність або ADCC), вивільнення медіаторів запалення, плацентарне перенесення і контроль продукції імуноглобулінів. У переважних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти) за даним винаходом зв'язуються з рецептором Fc-гамма. В альтернативних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди відповідно до винаходу можуть включати константну область, що позбавлена однієї або більше ефекторних функцій (наприклад, активності ADCC) і/або не здатна зв'язувати рецептор Fc γ .

Деякі варіанти здійснення даного винаходу включають антитіла, у яких щонайменше одна амінокислота в одному або більше доменах константної області видалена або іншим способом змінена так, щоб забезпечити бажані біохімічні характеристики, такі як знижені або підвищені ефекторні функції, здатність до нековалентної димеризації, збільшена здатність до локалізації в місці пухлини, знижений час напівжиття в сироватці або підвищений час напівжиття в сироватці в порівнянні з повним, незмінним антитілом з приблизно тією ж імуногенністю. Наприклад, деякі антитіла для застосування в діагностичних і терапевтично методах, описаних у даному документі, являють собою антитіла з видаленими доменами, що включають поліпептидний ланцюг, подібний з важким ланцюгом імуноглобуліну, але у яких відсутня щонайменше частина одного або більше доменів важкого ланцюга. Наприклад, у деяких антитілах один повний домен константної області модифікованого антитіла буде видалений, наприклад буде видалений весь або частина домену CH2.

У деяких інших варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди включають константні області, що походять від різних ізотипів антитіл (наприклад, константні області від двох або більше з IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини). В інших варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди включають химерний шарнір (тобто шарнір, який включає шарнірні частини, що походять від шарнірних доменів різних ізотипів антитіл, наприклад верхній шарнірний домен від молекули IgG4 і середній шарнірний домен від IgG1). В одному варіанті здійснення зв'язувальні поліпептиди включають область Fc або її частину від молекули IgG4 людини і мутацію Ser228Pro (по нумерації EU) у каркасі шарнірної області молекули.

У деяких варіантах здійснення частина Fc може бути мутована для збільшення або зменшення ефекторної функції з використанням способів, відомих у даній галузі техніки. Наприклад, делеція або інактивація (за допомогою точкових мутацій або інших методів) домену константної області може зменшити зв'язування рецептора Fc циркулюючого модифікованого антитіла, тим самим збільшуючи локалізацію в пухлині. В інших випадках може бути так, що модифікації константної області, узгоджувані з даним винаходом, ослаблюють зв'язування комплементу і тим самим зменшують період напівжиття в сироватці і неспецифічне зв'язування кон'югованого цитотоксину. Ще одні модифікації константної області можуть бути використані для модифікації дисульфідних зв'язків або олігосахаридних частин, що дозволяє підсилювати локалізацію завдяки збільшенню антигенної або специфічності гнучкості. Одержаний фізіологічний профіль, біодоступність і інші біохімічні ефекти модифікацій, такі як локалізація в пухлині, біорозподілення і період напівжиття в сироватці, можуть бути легко виміряні і кількісно оцінені з використанням добре відомих імунологічних методів без зайвого експериментування.

У деяких варіантах здійснення домен Fc, застосований як антитіло за винаходом, являє собою варіант Fc. При застосуванні в даному документі, термін "варіант Fc" стосується області Fc, що має щонайменше одну амінокислотну заміну в порівнянні з доменом Fc дикого типу, похідним якого є зазначений домен Fc. Наприклад, коли домен Fc походить від антитіла IgG1 людини, варіант Fc зазначеного домену Fc IgG1 людини включає щонайменше одну амінокислотну заміну в порівнянні з зазначеним доменом Fc.

Амінокислотна(і) заміна(и) варіанта Fc можуть бути локалізовані в будь-якому положенні (тобто в будь-якому положенні амінокислоти по EU) у межах домену Fc. В одному варіанті здійснення варіант Fc включає заміну в положенні амінокислоти, локалізованому в домені

шарніра або його частині. В іншому варіанті здійснення варіант Fc включає заміну в положенні амінокислоти, локалізованому в домені CH₂ або його частині. В іншому варіанті здійснення варіант Fc включає заміну в положенні амінокислоти, локалізованому в домені CH₃ або його частині. В іншому варіанті здійснення варіант Fc включає заміну в положенні амінокислоти, локалізованому в домені CH₄ або його частині.

У зв'язувальних поліпептидах відповідно до винаходу може використовуватися будь-який відомий у даній галузі техніки варіант Fc, який, як відомо, створює поліпшення (наприклад, зниження або посилення) ефекторної функції і/або зв'язування з FcR. Зазначені варіанти Fc можуть включати, наприклад, будь-яку з амінокислотних замінів, розкритих у міжнародних публікаціях PCT WO 88/07089A1, WO 96/14339A1, WO 98/05787A1, WO 98/23289A1, WO 99/51642A1, WO 99/58572A1, WO 00/09560A2, WO 00/32767A1, WO 00/42072A2, WO 02/44215A2, WO 02/060919A2, WO 03/074569A2, WO 04/016750A2, WO 04/029207A2, WO 04/035752A2, WO 04/063351A2, WO 04/074455A2, WO 04/099249A2, WO 05/040217A2, WO 05/070963A1, WO 05/077981A2, WO 05/092925A2, WO 05/123780A2, WO 06/019447A1, WO 06/047350A2 і WO 06/085967A2 або патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253 і 7083784, кожний з яких включений у даний опис як посилання. В одному ілюстративному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид за винаходом може включати варіант Fc, який включає амінокислотну заміну в положенні 268 по EU (наприклад, H268D або H268E). В іншому ілюстративному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид відповідно до винаходу може включати амінокислотну заміну в положенні 239 по EU (наприклад, S239D і S239E) і/або в положенні 332 по EU (наприклад, I332D або I332Q).

У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид за винаходом може включати варіант Fc, який включає амінокислотну заміну, що змінює незалежні від антигену ефекторні функції антитіла, зокрема період напівжиття зв'язувального поліпептиду в циркуляторному руслі. Такі зв'язувальні поліпептиди характеризуються або підвищенням, або зниженням зв'язуванням з FcRn у порівнянні зі зв'язувальними поліпептидами з відсутністю цих замінів, отже, мають підвищений або знижений період напівжиття в сироватці крові, відповідно. Варіанти Fc з поліпшеною спорідненістю до FcRn, як очікується, мають більш довгі періоди напівжиття в сироватці, і такі молекули мають успішне застосування в методах лікування ссавців, коли бажаний тривалий період напіввиведення антитіла, що вводиться, наприклад, для лікування хронічного захворювання або порушення. На відміну від цього, варіанти Fc зі зниженою афінністю зв'язування FcRn, як очікується, мають більш короткі періоди напівжиття, і такі молекули можуть бути також використані, наприклад, для введення ссавцю, коли може бути вигідний укорочений час циркуляції, наприклад, для діагностичної візуалізації in vivo або в ситуаціях, коли вихідне антитіло має токсичні побічні ефекти, коли воно присутнє в кровотоку протягом тривалих періодів часу. Варіанти Fc зі зниженою афінністю зв'язування FcRn також менш ймовірно будуть проходити через плаценту і, таким чином, можуть бути також корисні для лікування захворювань або порушень у вагітних жінок. Крім того, інші варіанти застосування, при яких може бути бажана знижена афінність зв'язування FcRn, включають такі варіанти застосування, у яких бажана локалізація в мозку, нирці і/або печінці. В одному ілюстративному варіанті здійснення змінені зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти) за винаходом характеризуються зниженням транспортом із судин через епітелій ниркових клубочків. В іншому варіанті здійснення змінені зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти) за винаходом характеризуються зниженням транспортом через гематоенцефалічний бар'єр (BBB) з мозку в судинну мережу. В одному варіанті здійснення антитіло зі зміненим зв'язуванням FcRn включає домен Fc, що має одну або більше амінокислотних замінів у межах "петлі, що зв'язує FcRn", домену Fc. Петля, що зв'язує FcRn, складається з амінокислотних залишків 280-299 (відповідно до нумерації EU). Приклади амінокислотних замінів, що змінюють FcRn-зв'язувальну активність, розкриті в публікації міжнародної заявки PCT № WO 05/047327, що включена в даний документ як посилання. У деяких ілюстративних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти) за винаходом включають домен Fc, що має одну або більше з наступних замінів: V284E, H285E, N286D, K290E і S304D (по нумерації EU). В інших ілюстративних варіантах здійснення зв'язувальні молекули за винаходом включають домен Fc людини з подвійною мутацією H433K/N434F (див., наприклад, патент США № 8163881).

В інших варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди для використання в діагностичних і терапевтичних методах, описаних у даному документі, мають константну область, наприклад константну область важкого ланцюга IgG1 або IgG4, що змінена для зменшення або усунення

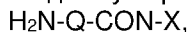
глікозилювання. Наприклад, зв'язувальні поліпептиди (наприклад, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти) за даним винаходом можуть також включати варіант Fc, який включає амінокислотну заміну, що змінює глікозилювання Fc антитіла. Наприклад, зазначений варіант Fc може мати знижене глікозилювання (наприклад, N- або O-зв'язане глікозилювання). В ілюстративних варіантах здійснення варіант Fc включає знижене глікозилювання N-зв'язаного глікану, звичайно виявлюваного в положенні амінокислоти 297 (по нумерації EU). В іншому варіанті здійснення антитіло має амінокислотну заміну поблизу або в межах мотиву глікозилювання, наприклад мотиву N-зв'язаного глікозилювання, що включає амінокислотну послідовність NXT або NXS. У конкретному варіанті здійснення антитіло включає варіант Fc з амінокислотною заміною в положенні амінокислоти 228 або 299 (по нумерації EU). У більш конкретних варіантах здійснення антитіло включає константну область IgG1 або IgG4, що включає мутацію S228P і T299A (по нумерації EU).

VIII. Ефекторні частини

У деяких варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям включають ефекторні частини. У цілому ці ефекторні частини кон'юговані (або безпосередньо, або через лінкер) з N-зв'язаним гліканом на зв'язувальному поліпептиді (наприклад, з N-зв'язаним гліканом, зв'язаним з N298 (по нумерації EU) домену CH2 і/або з N114 домену CH1 (при нумерації по Кебату)). У деяких варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид являє собою повнорозмірне антитіло, що включає два домени CH1 з гліканом у положенні 114 по Кебату, де обидва глікани кон'юговані з однією або більше ефекторними частинами.

Будь-яка ефекторна частина може бути додана до зв'язувальних поліпептидів, розкритих у даному документі. Ефекторні частини переважно надають зміненому антитілу або його фрагменту неприродну функцію без суттєвої зміни властивої активності зв'язувального поліпептиду. Ефекторна частина може являти собою, наприклад, але не обмежуючись цим, терапевтичний або діагностичний агент. Модифікований зв'язувальний поліпептид (наприклад, антитіло) за даним винаходом може включати одну або більше ефекторних частин, що можуть бути однаковими або відрізнятися.

В одному варіанті здійснення ефекторна частина може мати формулу (I):



Формула (I)

де:

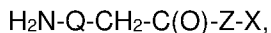
A) Q являє собою NH або O; і

B) CON є з'єднуючою частиною; і

C) X являє собою терапевтичний агент, як визначено в даному описі.

З'єднуюча частина зв'язує терапевтичний агент з H₂N-Q-. З'єднуюча частина може включати щонайменше один з будь-яких придатних компонентів, відомих фахівцям у даній галузі техніки, включаючи, наприклад, алкіленільний компонент, поліетиленглікольний компонент, полі(гліцин)овий компонент, полі(оксазолін)овий компонент, карбонільний компонент, компонент, що походить з цистеїнамідом, компонент, що походить з валіну, з'єданого з цитруліном, і компонент, що походить з 4-амінобензилкарбамату, або будь-яке їх сполучення.

В іншому варіанті здійснення ефекторна частина формули (I) може являти собою формулу (Ia):



Формула (Ia)

у якій:

A) Q являє собою NH або O; і

B) Z являє собою -Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f,

де

i) Cys являє собою компонент, що походить від цистеїнамідом;

ii) MC являє собою компонент, що походить від малеїмідом;

iii) VC являє собою компонент, що походить від цитруліну;

iv) PABC являє собою компонент, що походить від 4-амінобензилкарбамату;

v) X являє собою терапевтичний агент, як визначено в даному описі;

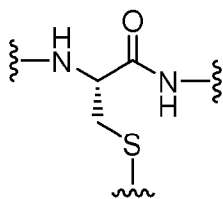
vi) a дорівнює 0 або 1;

vii) b дорівнює 0 або 1;

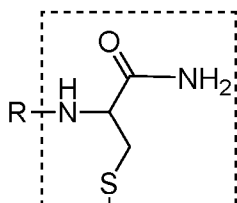
viii) c дорівнює 0 або 1; і

ix) f дорівнює 0 або 1.

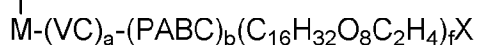
"Компонент, що походить від цистеїнамідом", являє собою точку приєднання до H₂N-Q-CH₂-C(O)-. В одному варіанті здійснення "компонент, що походить від цистеїнамідом", може належати до однієї або більше частин ефекторного фрагмента, що має структуру:



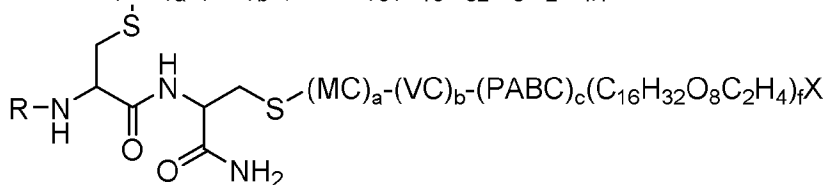
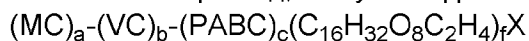
В одному варіанті здійснення компонент "Cys" ефекторного фрагмента може включати одну таку частину. Наприклад, наступна структура є демонстрацією ефекторного фрагмента з однією такою частиною (де компонент "Cys" позначається боксом з пунктирною лінією):



5



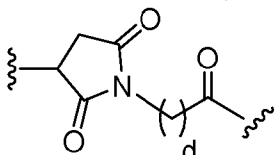
В іншому варіанті здійснення компонент "Cys" ефекторного фрагмента може включати дві або більше таких частин. Наприклад, наступний фрагмент включає дві такі частини:



10

Як можна бачити зі структури, кожен компонент "Cys" несе групу $-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_fX$.

В одному варіанті здійснення вираз "компонент, що походить з малеїміду", може належати до будь-якої частини ефекторного фрагмента, що має структуру:

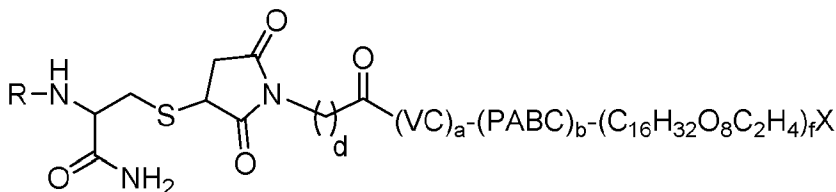


15

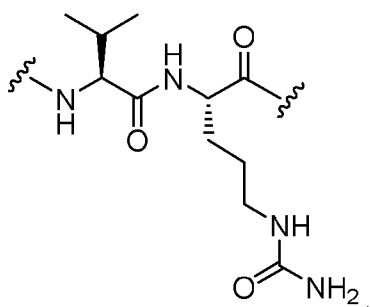
у якій d являє собою ціле число від 2 до 5. Кількість компонентів MC, включених у будь-яку групу $Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_fX$ у ефекторній частині, вказується підрядковим індексом "a" і може складати 0 або 1. В одному варіанті здійснення a дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення b дорівнює 0.

20

В одному варіанті здійснення компонент "Cys" може бути з'єднаний з компонентом "MC" через атом сірки в компоненті "Cys", як зазначено в боксі з пунктирною лінією в наступній структурі:

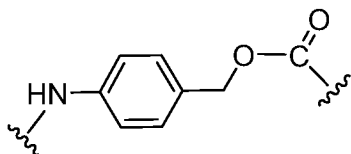


В одному варіанті здійснення вираз "компонент, що походить з валіну в сполученні з цитруліном", може належати до будь-якої частини ефекторного фрагмента з наступною структурою:



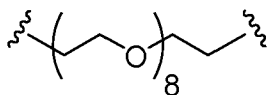
Кількість компонентів VC, включених у будь-яку групу Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X у ефекторній частині, вказується підрядковим індексом "b" і може складати 0 або 1. В одному варіанті здійснення b дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення b дорівнює 0.

5 В одному варіанті здійснення вираз "компонент, що походить з 4-амінобензилкарбамату", може належати до будь-якої частини ефекторного фрагмента з наступною структурою:



10 Кількість компонентів PABC, включених у будь-яку групу Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X у ефекторній частині, вказується підрядковим індексом "c" і може складати 0 або 1. В одному варіанті здійснення c дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення c дорівнює 0.

В одному варіанті здійснення "C₁₆H₃₂O₈C₂H₄" належить до наступної структури:



15 Кількість одиниць C₁₆H₃₂O₈, включених у будь-яку групу Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X у ефекторній частині молекули, вказується підрядковим індексом "f". В одному варіанті здійснення f дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення f дорівнює 0.

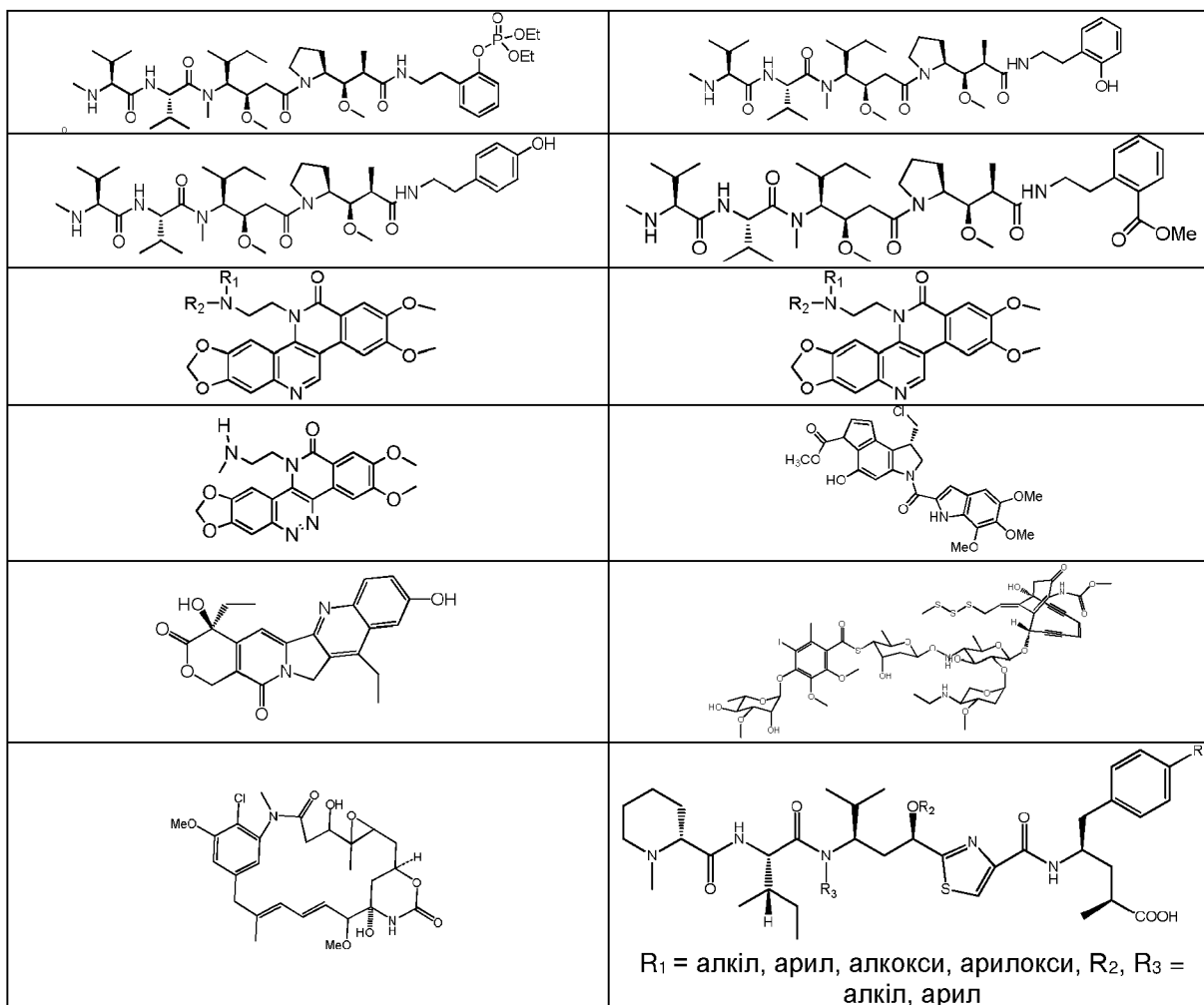
В одному варіанті здійснення a дорівнює 1, b дорівнює 1, c дорівнює 1 і f дорівнює 0.

а) Терапевтичні ефекторні частини

20 У деяких варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям кон'юговані з ефекторною частиною, що включає терапевтичний агент, наприклад частину ліків (або проліків) або радіоактивної сполуки. В одному варіанті здійснення терапевтичний агент являє собою цитотоксин. Приклади цитотоксичних ефекторних частин представлені в даному документі в таблиці 1.

Таблиця 1

Приклади цитотоксичних ефекторних частин



Подальші приклади лікарських частин включають протизапальні, протипухлинні, антиінфекційні (наприклад, протигрибкові, антибактеріальні, антипаразитарні, протівірусні і т. д.) і анестезуючі терапевтичні агенти. В іншому варіанті здійснення лікарська частина являє собою протираковий агент. Приклади протиракових агентів включають, але не обмежуються цим, цитостатики, інгібітори ферментів, регулятори генів, цитотоксичні нуклеозиди, агенти, що зв'язують тубулін, або інгібітори тубуліну, інгібітори протеасом, гормони й антагоністи гормонів, протиангіогенні агенти тощо. Приклади цитостатичних протиракових агентів включають алкілувальні агенти, такі як антрациклінове сімейство ліків (наприклад, адриаміцин, карміноміцин, циклоспорин-А, хлорохін, метоптерин, мітраміцин, порфіроміцин, стрептонігрин, антрацендіони й азиридици). Інші цитостатичні протиракові агенти включають інгібітори синтезу ДНК (наприклад, метотрексат і дихлорметотрексат, 3-аміно-1,2,4-бензотриазину 1,4-діоксид, аміноптерин, цитозин β-D-арабінофуранозид, 5-фтор-5'-дезоксіуридин, 5-фторурацил, ганцикловір, гідроксисечовину, актиноміцин-D і мітоміцин С), інтеркалятори ДНК або агенти поперечного зшивання (наприклад, блеоміцин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамід, цис-діамінплатину(II), дихлорид (цисплатин), мелфалан, мітоксантрон і оксаліплатин) і ДНК-РНК-регулятори транскрипції (наприклад, актиноміцин D, даунорубіцин, доксорубіцин, гомогарингтонін і ідарубіцин). Інші приклади цитостатичних агентів, що сумісні з даним винаходом, включають анзаміцинбензохінони, хіноїдні похідні (наприклад, хінолони, геністеїн, бактакілін), бусульфан, іфосфамід, мехлоретамін, триазихіон, діазихіон, карбазилхіон, індолохіон EO9, діазиридинілбензохінониметил DZQ, триетиленфосфорамід і сполуки нітрососечовини (наприклад, кармустин, ломустин, семустин).

Приклади цитотоксичних нуклеозидних протиракових агентів включають, наприклад, аденозинарабінозид, цитарабін, цитозинарабінозид, 5-фторурацил, флударабін, флоксурин, фторафур і 6-меркаптопурин. Приклади протиракових агентів, що зв'язують тубулін, включають таксоїди (наприклад, паклітаксел, доцетаксел, таксан), нокодазол, ризоксин, доластатини (наприклад, доластатин-10, -11 або -15), колхіцин і колхіциноїди (наприклад, ZD6126), комбретастатини (наприклад, комбретастатин А-4, AVE-6032) і алкалоїди барвінку (наприклад,

вінбластин, вінкрисдин, віндезин і вінорелбін (навелбін)). Приклади протиракових гормонів і антагоністів гормонів включають кортикостероїди (наприклад, преднізон), прогестини (наприклад, гідроксипрогестерон або медропрогестерон), естрогени (наприклад, діетилстилбестрол), антиестрогени (наприклад, тамоксифен), андрогени (наприклад, тестостерон), інгібітори ароматази (наприклад, аміноглутетимід), 17-(аліламіно)-17-деметоксигелданаміцин, 4-аміно-1,8-нафталід, апігенін, брефелдин А, циметидин, дихлорметилендифосфонову кислоту, лейпролід (лейпрорелін), рилізінг-гормон лютеїнізуючого гормону, піфітрин-А, рапаміцин, сексстероїдзв'язувальний глобулін і тапсигаргін. Приклади протиракових, антиангіогенних сполук включають ангіостатин К1-3, DL-а-орнітин-дифторметилорнітин, ендостатин, фумагілін, геністеїн, міноциклін, стауроспорин і (±)-талідомід.

Приклади протиракових інгібіторів ферментів включають, але не обмежуються цим, S(+)-камптотецин, куркумін, (-)-дегуелін 5,6-дихлорбензімідазол-1-β-D-рибофуранозид, етопозид, форместан, фострієцин, гіспідин, 2-іміно-1-імідазолідиноцтову кислоту (циклокреатин), мевінолін, трихостатин А, тирфостин AG 34 і тирфостин AG 879.

Приклади протиракових регуляторів генів включають 5-аза-2'-дезоксцитидин, 5-азацитидин, холекальциферол (вітамін D3), 4-гідрокситамоксифен, мелатонін, міфепристон, ралоксифен, транс-ретиналь (альдегіди вітаміну А), ретиноєву кислоту, кислотне похідне вітаміну А, 9-цис-ретиноєву кислоту, 13-цис-ретиноєву кислоту, ретинол (вітамін А), тамоксифен і троглітазон.

Інші переважні класи протиракових агентів включають, наприклад, птеридинове сімейство ліків, діїнені і подофілотоксини. Особливо придатні члени цих класів включають, наприклад, метоптерин, подофілотоксин або похідні подофілотоксину, такі як етопозид або етопозиду фосфат, лейросидин, віндезин, лейрозин тощо.

Ще одні протиракові агенти, що сумісні з указаннями даного опису, включають ауристатици (наприклад, ауристатин Е і монометилауристан Е), гелданаміцин, каліхеаміцин, грамїцидин D, майтансіноїди (наприклад, майтансин), неокарциностатин, топотекан, таксани, цитохалазин В, етидію бромід, еметин, тенопозид, колхіцин, дигідроксіантрациндіон, мітоксантрон, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол, пуроміцин і їх аналоги або гомологи.

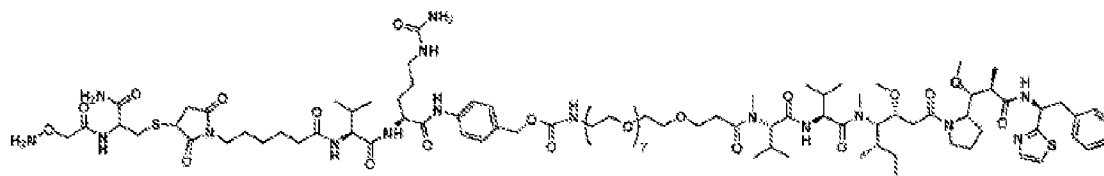
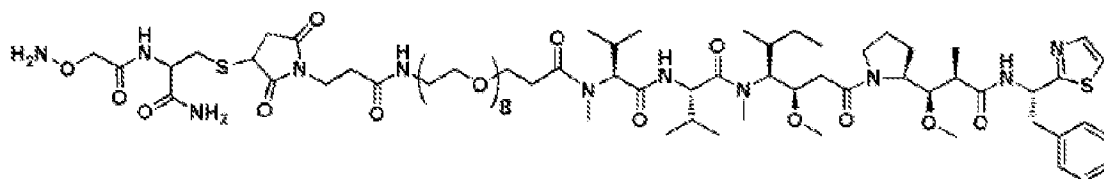
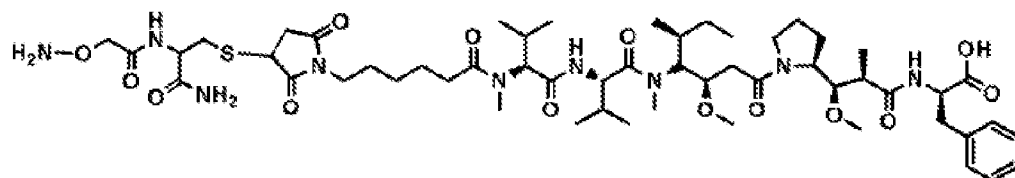
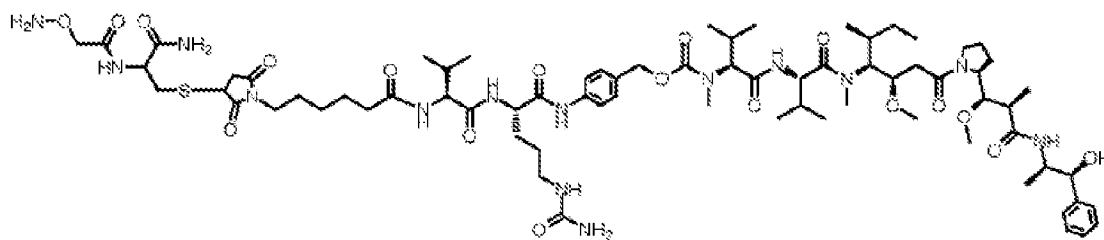
Ще одні протиракові агенти, що сумісні з указаннями даного опису, включають похідні томаїміцину, похідні майтансіну, похідні криптофіцину, похідні антрацикліну, похідні бісфосфонатів, похідні лептоміцину, похідні стрептонігріну, похідні ауристатину і похідні дуокарміцину.

Інший клас сумісних протиракових агентів, що можуть бути використані як лікарські частини, являє собою радіосенсибілізуючі ліки, які можуть бути ефективно спрямовані на пухлинні або імунореактивні клітини. Такі лікарські частини підвищують чутливість до іонізуючої радіації, тим самим збільшуючи ефективність променевої терапії. Не обмежуючись якою-небудь теорією, антитіла, модифіковані радіосенсибілізуючою лікарською частиною і інтерналізовані пухлинною клітиною, будуть здійснювати доставку радіосенсибілізатора ближче до ядра, де радіосенсибілізація буде максимальною. Антитіла, які втрачають радіосенсибілізуючу частину, повинні будуть швидко виводитися з крові, локалізуючи радіосенсибілізуючий агент, що залишився, у пухлинні-мішені і забезпечуючи мінімальне захоплення в нормальних тканинах. Після кліренсу з крові додаткова променева терапія може бути здійснена за допомогою зовнішнього пучка випромінювання, спрямованого конкретно до пухлини, радіоактивності, безпосередньо імплантованої в пухлину, або за допомогою системної радіоімунотерапії тим же модифікованим антитілом.

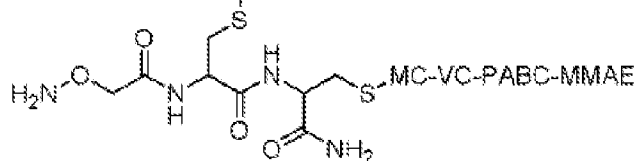
В одному варіанті здійснення терапевтичний агент включає радіонукліди або радіоактивні мітки з високою енергією іонізуючого випромінювання, здатною викликати множинні розриви ланцюгів в ядерній ДНК, що приводить до загибелі клітин. Приклади радіонуклідів з високою енергією включають: ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re і ^{188}Re . Ці ізотопи, як правило, дають α- або β-частинки з високою енергією, що мають коротку довжину шляху. Такі радіонукліди викликають загибель клітин, у безпосередній близькості до яких вони знаходяться, наприклад пухлинних клітин, до яких прикріплюється або в які входить кон'югат. Вони мало впливають або не впливають на неприкріплені клітини і по суті не імуногенні. Альтернативно, ізотопи з високою енергією можуть бути створені шляхом термічного опромінення в іншому випадку стабільного ізотопу, наприклад, як у випадку бор-нейтрон-захоплюючої терапії (Guan et al., PNAS, 95:13206-10, 1998).

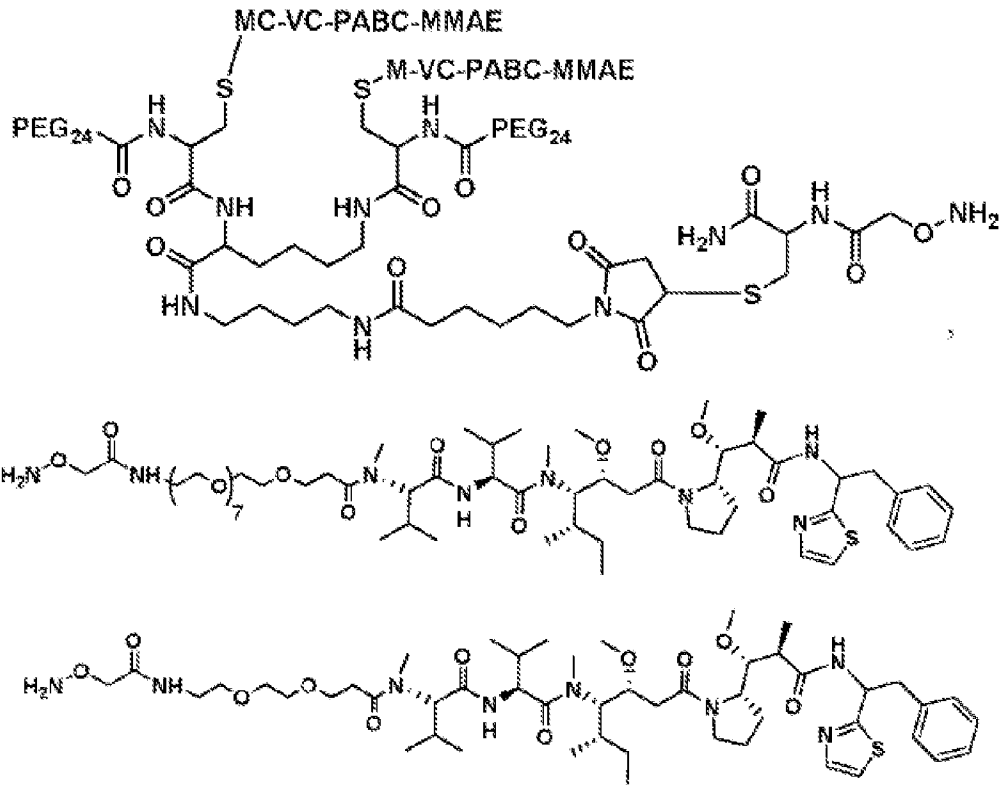
В одному варіанті здійснення терапевтичний агент вибраний з MMAE, MMAF і PEG8-Do110.

Приклади терапевтичних ефекторних частин включають структури:

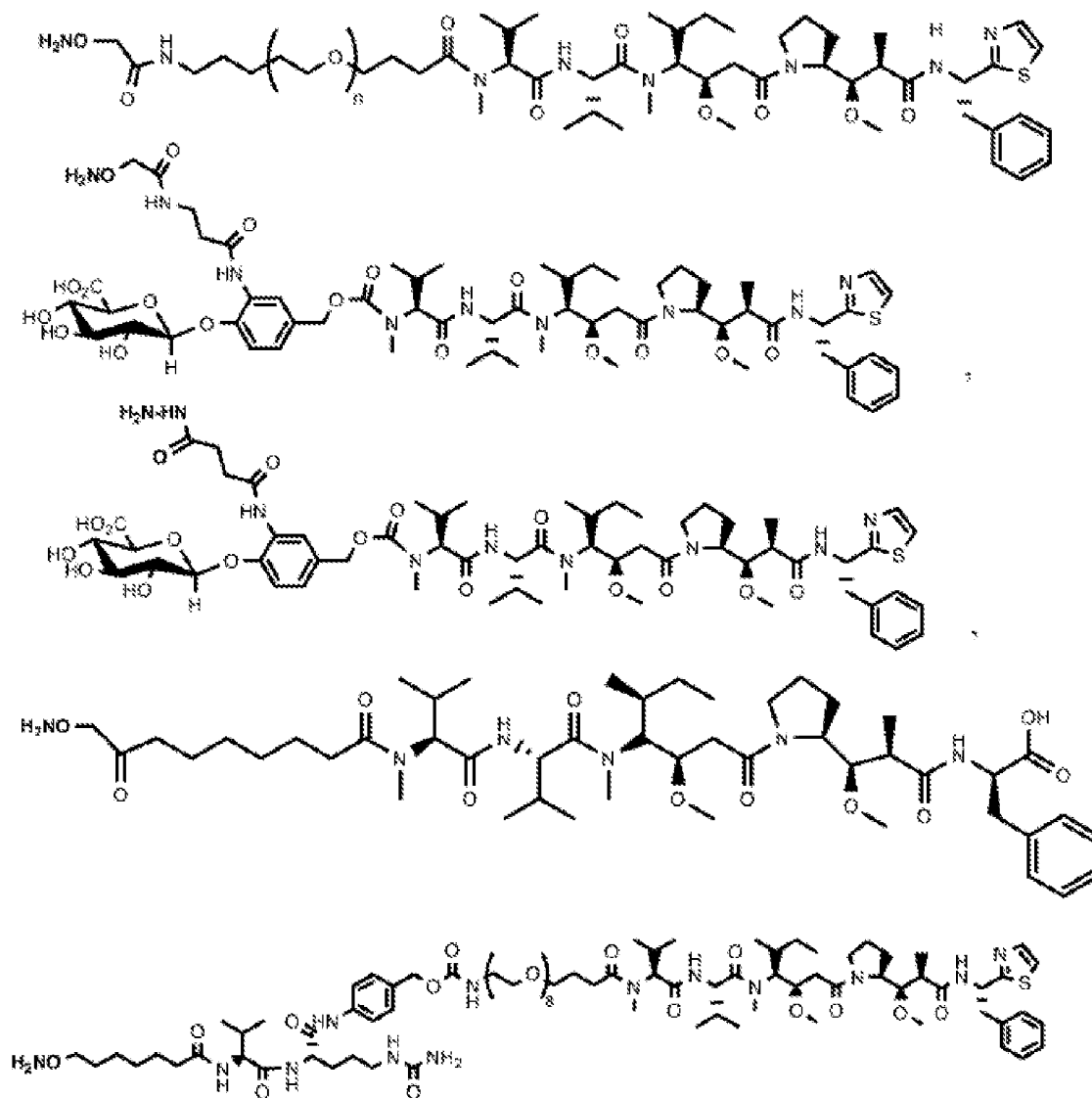


MC-VC-PABC-MMAE





В одному варіанті здійснення ефекторна частина вибрана з:



У визначених варіантах здійснення ефекторна частина містить більше одного терапевтичного агента. Ці численні терапевтичні агенти можуть бути однаковими або різними.

5 і. Діагностичні ефекторні частини

У деяких варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям кон'юговані з ефекторною частиною, що включає діагностичний агент. В одному варіанті здійснення діагностичний агент являє собою невелику молекулу, що піддається визначенню, мічену, наприклад, біотином, флуорофорами, хромофорами, зондами парамагнітного резонансу або радіоактивними мітками. Приклади флуорофорів включають флуоресцентні барвники (наприклад, флуоресцеїн, родамін тощо) і інші люмінесцентні молекули (наприклад, люмінал). Флуорофор може бути чутливим до навколишнього середовища так, що його флуоресценція змінюється, якщо він розташований у безпосередній близькості до одного або більше залишків у модифікованому зв'язувальному поліпептиді, що піддається структурним змінам при зв'язуванні субстрату (наприклад, зондів на основі дансильної групи). Приклади радіоактивних міток включають невеликі молекули, що містять атоми з одним або більше ядрами з низькою чутливістю (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In тощо). Переважно, радіонуклід являє собою гамма-, фотон- або позитрон-випромінюючі радіонукліди з періодом напіврозпаду, придатним для забезпечення активності або виявлення після часу, що пройшов між введенням і локалізацією в місці візуалізації.

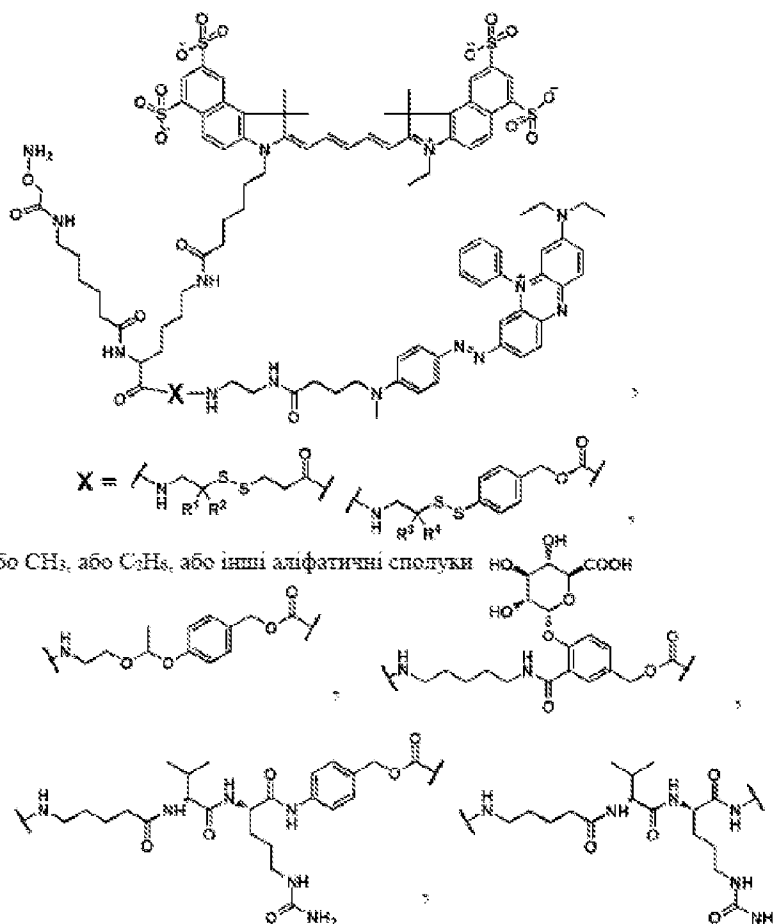
В одному варіанті здійснення діагностичний агент являє собою поліпептид. Приклади діагностичних поліпептидів включають ферменти з флуорогенною або хромогенною активністю, наприклад здатністю розщеплювати субстрат, що утворює як продукт флуорофор або хромофор (тобто репортерні білки, такі як люцифераза). Інші діагностичні білки можуть мати

внутрішню флуорогенну або хромогенну активність (наприклад, зелені, червоні і жовті флуоресцентні біолюмінесцентні білки-екворини зі світних морських організмів) або вони можуть включати білок, що містить одне або декілька низькоенергетичних радіоактивних ядер (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In тощо).

5 Стосовно використання радіоактивно мічених кон'югатів у сполученні з даним винаходом, зв'язувальні поліпептиди за даним винаходом можуть бути помічені безпосередньо (наприклад, шляхом йодування) або можуть бути помічені непрямо шляхом використання хелатуючого агента. При застосуванні в даному документі обидва вирази "непряме промічування" і
10 "непрямий підхід до промічування" означають, що хелатуючий агент ковалентно приєднаний до зв'язувального поліпептиду і щонайменше один радіонуклід зв'язаний з хелатуючим агентом. Такі хелатуючі агенти звичайно називають біфункціональними хелатуючими агентами, оскільки вони зв'язують як поліпептид, так і радіоіотоп. Приклади хелатуючих агентів включають похідні 1-ізотіоцисматобензил-3-метилдіотелентриамінпентаоцтової кислоти (MX-DTPA) і
15 циклогексилдіетилентриамінпентаоцтової кислоти (CHX-DTPA). Інші хелатуючі агенти включають похідні P-DOTA і EDTA. Особливо переважні радіонукліди для непрямого промічування включають ^{111}In і ^{90}Y . Більшість досліджень по візуалізації використовує 5 мКі антитіла, міченого ^{111}In , оскільки ця доза є як безпечною, так і підвищує ефективність візуалізації в порівнянні з більш низькими дозами з оптимальною візуалізацією, що відбувається
20 через від трьох до шести днів після введення антитіла. Див., наприклад, Murray (1985), J. Nuc. Med. 26:3328, та Carraguillo et al. (1985), J. Nuc. Med. 26:67. Особливо переважним радіонуклідом для прямого промічування є ^{131}I . Фахівцям у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що нерадіоактивні кон'югати також можуть бути створені залежно від вибраного агента для кон'югації.

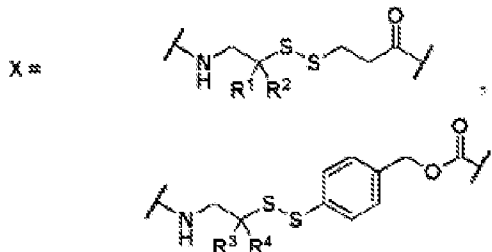
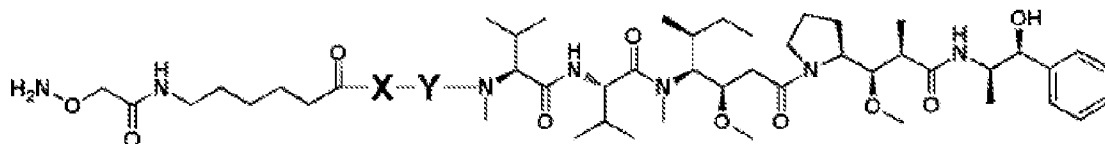
У деяких варіантах здійснення діагностична ефекторна частина являє собою зонд FRET
25 (резонансної передачі енергії флуоресценції). FRET використовували для різних діагностичних цілей, включаючи діагностику раку. Зонд FRET може включати розщеплюваний лінкер (лінкер, чутливий до ферменту або до рН), що з'єднує донорську й акцепторну частини зонда FRET, де розщеплення веде до підвищеної флуоресценції (включаючи ближню інфрачервону область) (див., наприклад, Cobos-Correa A. et. al. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in
30 pulmonary inflammation, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63; Gehrig S. et. al. Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012) Angew. Chem. Int. Ed., 51, 6258-6261).

В одному варіанті здійснення ефекторну частину вибирають з:

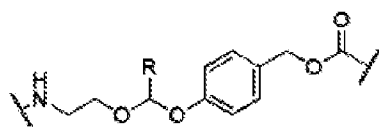


с. Функціоналізовані ефекторні частини

У деяких варіантах здійснення ефекторні частини за винаходом можуть бути функціоналізованими для включення додаткових груп на доповнення до самої ефекторної частини. Наприклад, ефекторна частина може містити розщеплювані лінкери, які вивільняють ефекторну частину від зв'язувального поліпептиду за певних умов. В ілюстративних варіантах здійснення ефекторна частина може включати лінкер, який розщеплюється клітинними ферментами і/або який чутливий до рН. Додатково або альтернативно, ефекторна частина може містити дисульфідний зв'язок, який розщеплюється внутрішньоклітинним глутатіоном при захопленні клітиною. Приклади дисульфідних і чутливих до рН лінкерів наведені нижче:

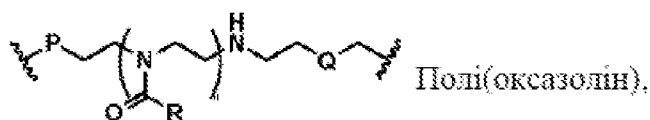
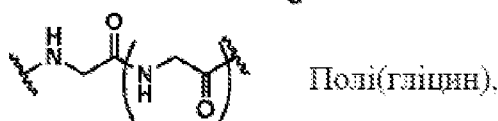
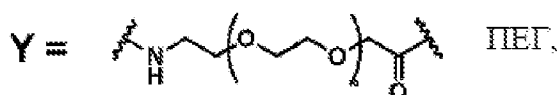
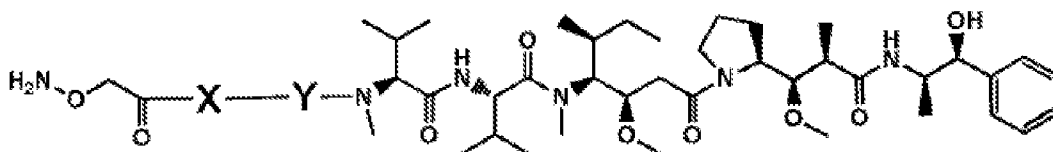


$\text{R}^{1-4} = \text{H}$ або CH_3 , або C_2H_5 , або інші аліфатичні сполуки



$\text{R} = \text{H}$ або заміщені або незаміщені алкільні, алкіларильні групи

У ще одних варіантах здійснення ефекторна частина може включати гідрофільні і біосумісні частини, такі як полі(гліцин), полі(оксазолін) або частини ПЕГ. Ілюстративні структури (Y) наведені нижче:



$\text{R} = \text{H}$, незаміщена або функціональна група, що містить алкільні групи,
 P і $\text{Q} =$ однакові або різні функціональні групи для зв'язування ліків, репортерних молекул і білка.

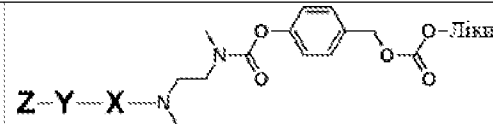
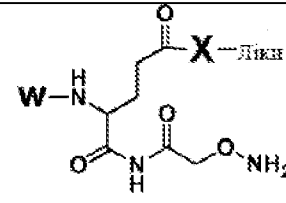
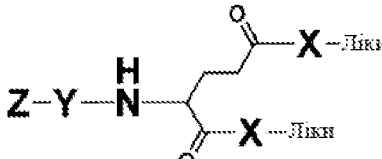
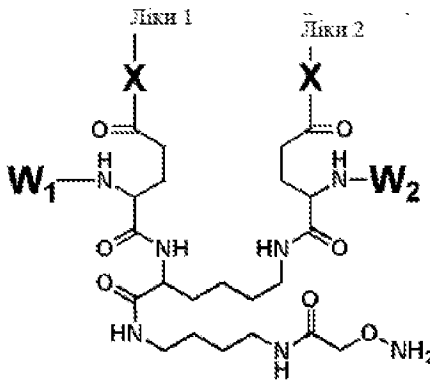
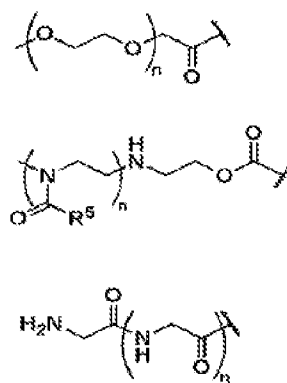
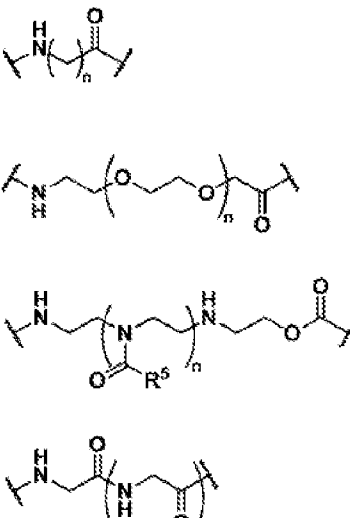
У деяких варіантах здійснення ефекторна частина містить амінооксигрупу, яка полегшує кон'югацію зв'язувального поліпептиду через стабільний оксимний зв'язок. Приклади ефекторних частин, що містять амінооксигрупи, представлені в даному документі в таблиці 2.

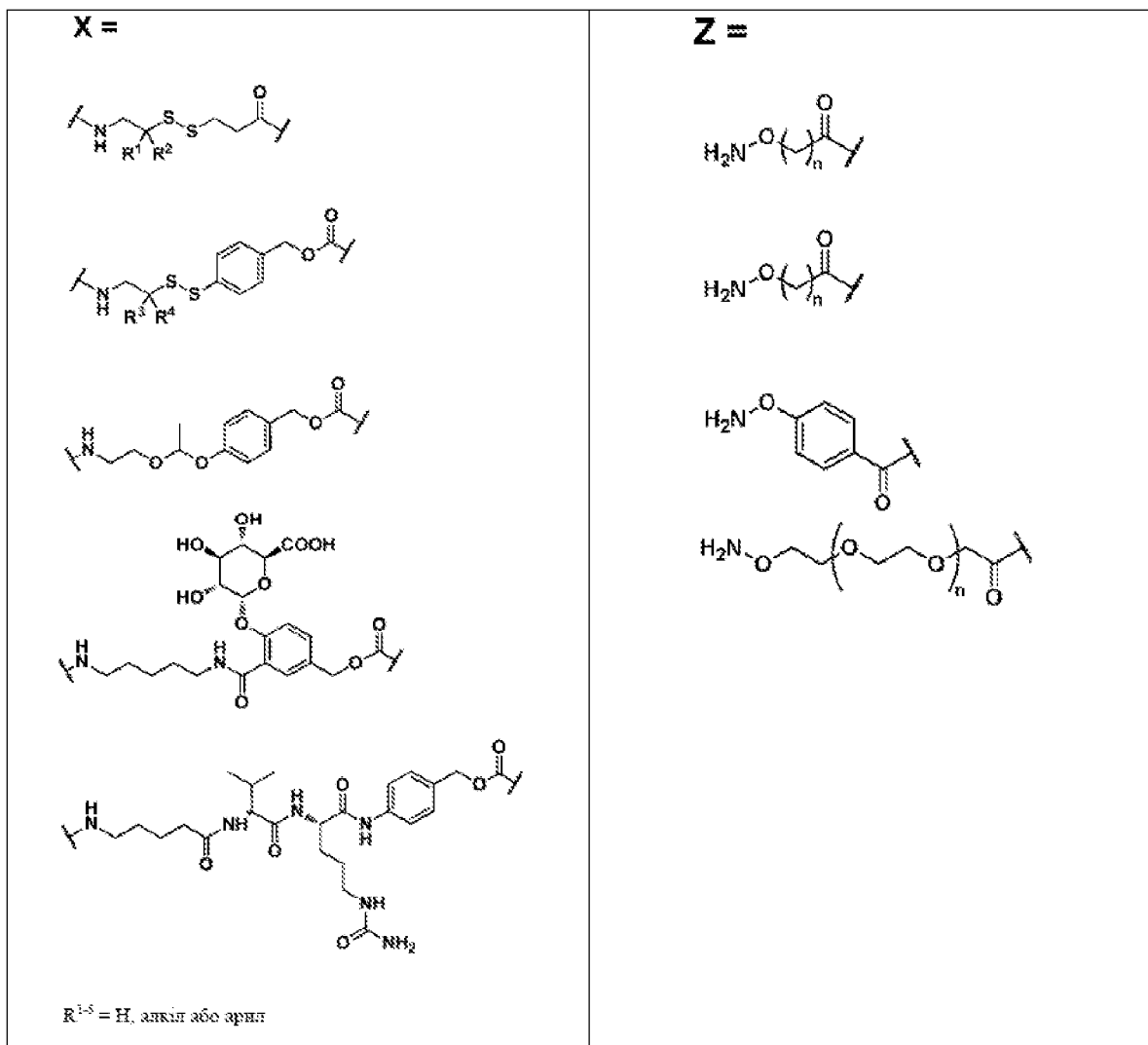
Таблиця 2

Приклади лінкерних частин, функціоналізованих амінооксигрупами

Приклади ефекторних амінооксигрупок (де X може являти собою будь-який лінкер, Y являє собою будь-який слейсер, і де X і/або Y є необов'язковими).

Ліки в даному документі можуть являти собою будь-які ліки з таблиці 1 опису. Ліки 1 і ліки 2 можуть бути однаковими або різними ліками.

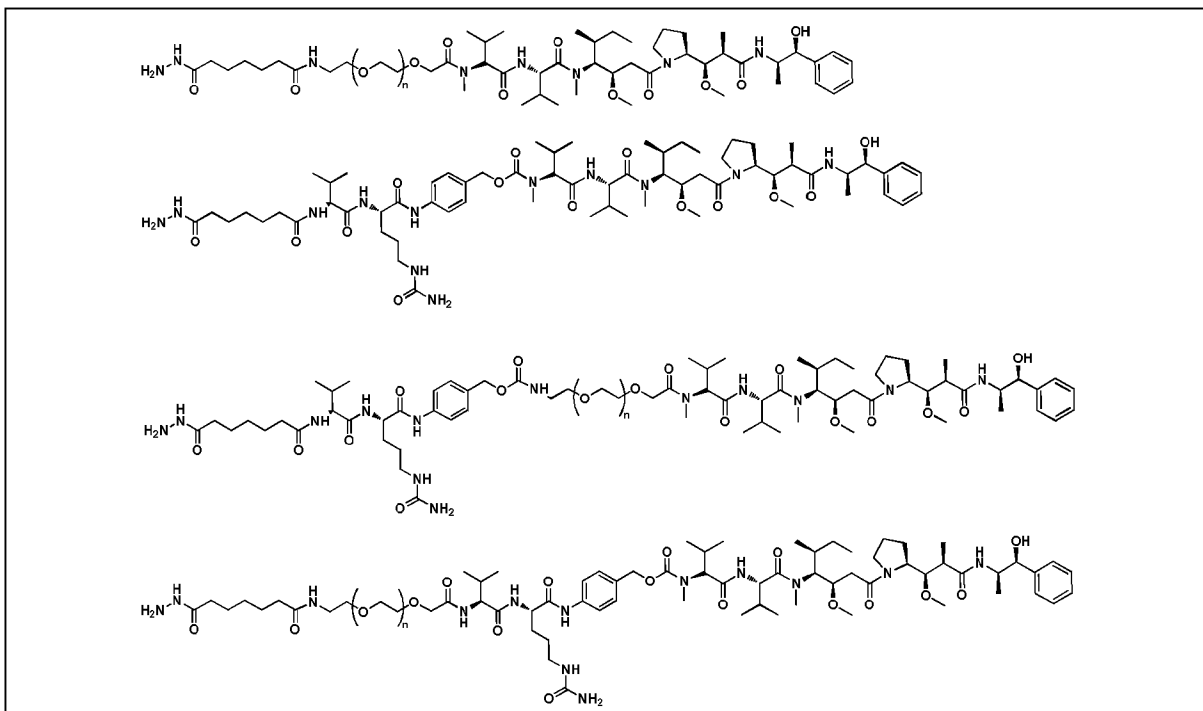
<p>Z-Y-X-Ліки</p>	
	
	<p>W, W1, W2 =</p> 
	<p>Y =</p> 



В інших варіантах здійснення ефекторна частина містить гідразид і/або N-алкіловану гідразинову групу для полегшення кон'югації зі зв'язувальним поліпептидом через стабільний гідразонової зв'язок. Приклади ефекторних частин, що містять амінооксигрупи, представлені в даному описі в таблиці 14.

5

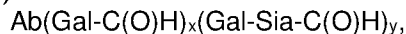
Ілюстративні гідразинові і/або гідразидні ефекторні частини



V. Кон'югація ефекторних частин з зв'язувальними поліпептидами

- У деяких варіантах здійснення ефекторні частини кон'югують (або безпосередньо, або через лінкерну групу) з окисленим гліканом (наприклад, окисленим N-зв'язаним гліканом) модифікованого зв'язувального поліпептиду (наприклад, зі сконструйованим гліканом у N298 домену Fc антитіла). Термін "окислений глікан" означає, що спиртовий замісник на глікані окислений з одержанням карбонільного замісника. Карбонільний замісник може вступати в реакцію з придатним нуклеофільним азотом з утворенням вуглець-азотного подвійного зв'язку. Наприклад, реакція карбонільної групи з амінооксигрупою або гідразиновою групою буде приводити до утворення оксиму або гідразину, відповідно. В одному варіанті здійснення карбонільний замісник являє собою альдегід. Придатні окислені глікани включають окислену галактозу й окислену сіалову кислоту.

- В одному варіанті здійснення модифікований поліпептид формули (II) може мати формулу (IIa):



Формула (IIa)

де

- A) Ab являє собою антитіло або інший зв'язувальний поліпептид, як визначено в даному описі;
- B) Gal є компонентом, що походить з галактози;
- C) Sia є компонентом, що походить з сіалової кислоти;
- D) x складає від 0 до 5; і
- E) y складає від 0 до 5,
- де щонайменше один з x і y не дорівнює 0.

- Будь-який метод з даної галузі хімії може бути використаний для кон'югації ефекторної частини (наприклад, ефекторної частини, що включає лінкерну групу) із гліканом (див., наприклад, статтю Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques. Academic Press (1996), що включена в даний документ у повному обсязі). У деяких варіантах здійснення залишок сахариду (наприклад, залишок сіалової кислоти або галактози) глікану спочатку окисляють (наприклад, з використанням періодату натрію або обробки галактозоксидазою) для створення реакційноздатної альдегідної групи. Ця альдегідна група вступає в реакцію з амінооксигрупою

або гідразиновою групою ефекторної частини з утворенням оксимного або гідразонового лінкера, відповідно. Приклади способів, що використовують цю загальну схему реакції, викладені в прикладах від 10 до 15.

У деяких варіантах здійснення нативні або сконструйовані глікани зв'язувального поліпептиду спочатку попередньо обробляють ферментом глікозилтрансферазою *in vitro* з одержанням кінцевого сахаридного залишку, який придатний для проведення реакції. Наприклад, спочатку може бути досягнуте сіалілування з використанням сполучення галактозилтрансферази (Gal T) і сіалілтрансферази (Sial T). У деяких варіантах здійснення 2-антенарні глікани, у яких відсутня галактоза (G0F або G0) або які містять тільки одну галактозу (G1F або G1), можуть бути перетворені в галактозиловані або сіаліловані структури більш високого порядку, придатні для кон'югації (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F або G2S2).

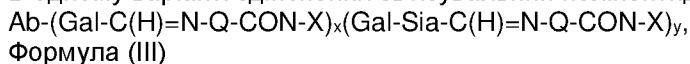
Ілюстративна схема кон'югації для одержання сіалілованих глікокон'югатів показана на фіг. 25С. Залишки сілової кислоти вводять ферментативно в сайт, специфічний для глікану антитіла (наприклад, сконструйованого глікану на N298 домену Fc), використовуючи сполучення галактозилтрансферази (Gal T) і сіалілтрансферази (Sial T). Введені залишки сілової кислоти потім окисляють за допомогою низької концентрації перйодату натрію з одержанням реакційноздатних альдегідів сілової кислоти, придатним чином взаємодіючих з лінкерами ліків (наприклад, з амінооксигрупами лінкерів ліків) для утворення кон'югатів антитіло-ліки (ADC) (наприклад, зв'язаних з оксимом ADC). Контролюючи кількість глікану і кількість залишків сілової кислоти при ремодельованні *in vitro*, фахівець у даній галузі техніки може точно контролювати співвідношення ліки-антитіло (DAR) у ADCs. Наприклад, якщо ~1 сілову кислоту додають на один 2-антенарний глікан (A1F) у кожному важкому ланцюзі, може бути однотипно одержане антитіло або зв'язувальний поліпептид з DAR 2.

VI. Модифіковані зв'язувальні поліпептиди

У деяких варіантах здійснення в даному винаході пропонуються модифіковані поліпептиди, що є продуктом кон'югації ефекторних частин, кон'югованих (або безпосередньо, або через лінкерний фрагмент) з окисленим гліканом (наприклад, окисленим N-зв'язаним гліканом) зміненого зв'язувального поліпептиду (наприклад, зі сконструйованим гліканом на N298 домену Fc антитіла).

У деяких варіантах здійснення,

В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид може мати формулу (III):



де:

A) Ab являє собою антитіло, як визначено в даному описі;

B) Q являє собою NH або O;

C) CON є з'єднуючим фрагментом, як визначено в даному описі; і

D) X являє собою терапевтичний або діагностичний агент, як визначено в даному описі;

E) Gal є компонентом, що походить з галактози;

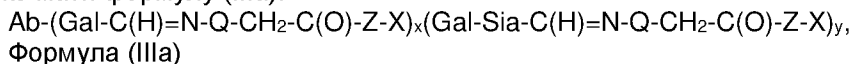
F) Sia є компонентом, що походить з сілової кислоти;

G) x складає від 0 до 5; і

H) y складає від 0 до 5,

де щонайменше один з x і y не дорівнює 0.

В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид може являти собою формулу (III) і може мати формулу (IIIa):



де:

A) Ab являє собою антитіло;

B) Q являє собою NH або O;

C) Z являє собою $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f$, де

i) Cys являє собою компонент, що походить з цистеїнамідю;

ii) MC являє собою компонент, що походить з малеїмідю;

iii) VC являє собою компонент, що походить з валіну, з'єданого з цитруліном;

iv) PABC являє собою компонент, що походить з 4-амінобензилкарбамату;

v) X являє собою терапевтичний або діагностичний агент, як визначено в даному описі;

vi) a дорівнює 0 або 1;

vii) b дорівнює 0 або 1;

viii) c дорівнює 0 або 1; і

захворювань, у індивідуума-савця, що потребує такого лікування. Переважно індивідуумом є людина.

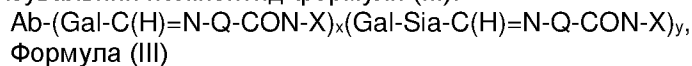
Зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям придатні для ряду різних варіантів застосування. Наприклад, у одному варіанті здійснення підлягаючий використанню зв'язувальний поліпептид придатний для зменшення або усунення клітин, що несуть епітоп, упізнаваний зв'язувальним доменом зв'язувального поліпептиду. В іншому варіанті здійснення підлягаючі використанню зв'язувальні поліпептиди ефективні для зниження концентрації в кровотоку або усунення з нього розчинного антигену. В одному варіанті здійснення зв'язувальні поліпептиди можуть зменшити розмір пухлини, інгібувати ріст пухлини і/або продовжити час виживання тварин, що несуть пухлини. Відповідно, цей винахід також стосується способу лікування пухлин у людини або іншої тварини шляхом введення такої людині або тварині ефективної нетоксичної кількості модифікованого антитіла. Фахівець у даній галузі техніки здатний за допомогою звичайних експериментів визначити, якою повинна бути ефективна, нетоксична кількість модифікованого зв'язувального поліпептиду з метою лікування злоякісних пухлин. Наприклад, терапевтично активна кількість модифікованого антитіла або його фрагментів може варіюватися залежно від таких факторів як стадія захворювання (наприклад, стадія I у порівнянні зі стадією IV), вік, стать, медичні ускладнення (наприклад, стани або захворювання з ослабленим імунітетом) і маса індивідуума, і здатність модифікованого антитіла викликати бажану відповідь у індивідуума. Режим дозування можна регулювати для забезпечення оптимальної терапевтичної відповіді. Наприклад, декілька роздільних доз можна вводити щодня або доза може бути пропорційно зменшена по показниках, призначених по терапевтичній ситуації.

Загалом, композиції, пропонувані в даному описі, можуть бути використані для профілактичного або терапевтичного лікування пухлини, яка включає будь-який антигенний маркер, що дозволяє направлено діяти на ракові клітини за допомогою модифікованого антитіла.

X. Способи введення модифікованих антитіл або їх фрагментів

Способи одержання і введення індивідууму зв'язувальних поліпептидів за даним розкриттям добре відомі фахівцями в даній галузі техніки або можуть бути легко ними визначені. Шлях введення зв'язувальних поліпептидів за даним розкриттям може являти собою пероральний, парентеральний шлях, введення шляхом інгаляції або місцевий шлях. Термін парентеральний, використовуваний у даному документі, включає внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньоочеревинне, внутрішньом'язове, підшкірне, ректальне або вагінальне введення. Звичайно переважними є внутрішньовенні, внутрішньоартеріальні, підшкірні і внутрішньом'язові форми парентерального введення. У той час як усі ці форми введення, мабуть, розглядаються як такі, що входять в обсяг даного розкриття, формою введення може бути розчин для ін'єкцій, зокрема, для внутрішньовенного або внутрішньоартеріального, або краплинного введення. Як правило, придатна фармацевтична композиція для введення може включати буфер (наприклад, ацетатний, фосфатний або цитратний буфер), поверхнево-активну речовину (наприклад, полісорбат), необов'язково стабілізуючий агент (наприклад, людський альбумін) і т. д. Проте, в інших методах, сумісних із указаннями даного документа, модифіковані антитіла можуть бути доставлені безпосередньо в місце аномальної клітинної популяції, тим самим збільшуючи експозицію хворої тканини з терапевтичним агентом.

В одному варіанті здійснення зв'язувальний поліпептид, що вводиться, являє собою зв'язувальний поліпептид формули (III):



де

- A) Ab являє собою антитіло, як визначено в даному описі;
 - B) Q являє собою NH або O;
 - C) CON є з'єднуючим фрагментом, як визначено в даному описі; і
 - D) X являє собою терапевтичний або діагностичний агент, як визначено в даному описі;
 - E) Gal є компонентом, що походить з галактози;
 - F) Sia є компонентом, що походить з сіалової кислоти;
 - G) x складає від 0 до 5; і
 - H) y складає від 0 до 5,
- де щонайменше один з x і y не дорівнює 0.

Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії й емульсії. Прикладами неводних розчинників є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як маслинова олія, і ін'єктовані органічні складні ефіри, такі як етилолеат.

Водні носії включають воду, спиртові/водні розчини, емульсії або суспензії, включаючи фізіологічні сольові і буферні середовища. У композиціях і способах за даним розкриттям фармацевтично прийнятні носії включають, але не обмежуються цим, 0,01-0,1M і переважно 0,05M фосфатний буфер або 0,8% фізіологічний розчин. Інші звичайні парентеральні носії

5 включають натрій-фосфатні розчини, декстрозу Рінгера, декстрозу і хлорид натрію, розчин Рінгера з лактатом або нелеткі олії. Внутрішньовенні носії включають рідкі і живильні наповнювачі, електролітні наповнювачі, такі як на основі декстрази Рінгера, тощо. Можуть також бути присутніми консерванти й інші добавки, такі як, наприклад, протимікробні агенти, антиоксиданти, хелатуючі агенти й інертні гази тощо. Більш конкретно, фармацевтичні

10 композиції, придатні для застосування у вигляді ін'єкцій, включають стерильні водні розчини (коли вони водорозчинні) або дисперсії і стерильні порошки для приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій для негайного прийому. У таких випадках композиція повинна бути стерильною і повинна бути рідкою до такої міри, щоб легко вводитися за допомогою шприца. Вона повинна бути стабільною в умовах одержання і зберігання і переважно повинна

15 бути захищена від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби. Носій може являти собою розчинник або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь тощо) і їх придатні суміші. Належну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом використання покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і

20 шляхом використання поверхнево-активних речовин.

Запобігання дії мікроорганізмів може бути досягнуте за допомогою різних антибактеріальних і протигрибкових агентів, наприклад парабенів, хлорбутанолу, фенолу, аскорбінової кислоти, тимеросалу і тому подібного. У багатьох випадках переважно включати в композицію ізотонічні агенти, наприклад цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт, сорбіт або хлорид натрію.

25 Пролонговане всмоктування ін'єкційних композицій може бути досягнуте шляхом включення в композицію агента, що затримує абсорбцію, наприклад моностеарату алюмінію і желатину.

У будь-якому випадку стерильні ін'єкційні розчини можуть бути приготовані шляхом введення активної сполуки (наприклад, модифікованого зв'язувального поліпептиду, одного або в сполученні з іншими активними агентами) у необхідній кількості у відповідному розчиннику з

30 одним інгредієнтом або зі сполученням інгредієнтів, перерахованих у даному описі, за потреби, з наступною стерилізацією фільтруванням. Як правило, дисперсії одержують шляхом включення активної сполуки в стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище й інші необхідні інгредієнти з тих, котрі перераховані вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів переважними способами приготування є вакуумне сушіння і ліофілізація, що дають порошок активного інгредієнта плюс будь-який додатковий

35 бажаний інгредієнт із його попередньо стерилізованого фільтрацією розчину. Препарати для ін'єкцій обробляють, поміщають у контейнери, такі як ампули, пакети, бутлі, шприци або флакони, і герметизують в асептичних умовах згідно зі способами, відомими в даній галузі техніки. Крім того, препарати можуть бути упаковані і продані у формі набору, такого як описані

40 в одночасно розглянутих заявках U.S.S.N. 09/259337 і U.S.S.N. 09/259338, кожна з яких включена в даний опис як посилання. Такі промислові виробы можуть переважно мати етикетки або вкладиші, які вказують на те, що пов'язані з ними композиції корисні для лікування індивідуума, що страждає від аутоімунних або пухлинних захворювань або схильний до них.

Ефективні дози композицій за даним винаходом для лікування описаних вище станів варіюються залежно від багатьох різних факторів, включаючи способи введення, сайт-мішень, фізіологічний стан хворого, чи є хворий людиною або твариною, інші ліки, що вводяться, і чи є лікування профілактичним або терапевтичним. Як правило, хворий є людиною, але лікувати також можна ссавців, що не є людиною, включаючи трансгенних ссавців. Лікувальні дози можна титрувати за допомогою рутинних способів, відомих фахівцям у даній галузі техніки, щоб

50 оптимізувати безпеку й ефективність.

Для пасивної імунізації зв'язувальним поліпептидом дозування може варіюватися в діапазоні, наприклад, від приблизно 0,0001 до 100 мг/кг і більш звичайно від 0,01 до 5 мг/кг (наприклад, 0,02 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг і т. д.) від маси тіла хазяїна. Наприклад, дозування можуть складати 1 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг маси тіла, або в діапазоні

55 1-10 мг/кг, переважно щонайменше 1 мг/кг. Дози проміжного продукту в зазначених діапазонах також призначені для включення в обсяг даного розкриття. Індивідуумам можна вводити такі дози щодня, через день, щотижня або відповідно до будь-якої іншої схеми, визначеної емпіричним аналізом. Приклад лікування включає введення в множинних дозах протягом тривалого періоду, наприклад щонайменше шести місяців. Додаткові схеми прикладів лікування

60 включають введення один раз у кожен два тижні або один раз на місяць, або один раз у кожен від

3 до 6 місяців. Приклади схем дозування включають 1-10 мг/кг або 15 мг/кг у наступні дні, 30 мг/кг через день або 60 мг/кг щотижня. У деяких методах два або більше моноклональних антитіл з різною специфічністю зв'язування вводять одночасно, і в цьому випадку доза кожного антитіла, що вводиться, знаходиться в межах зазначених діапазонів.

5 Зв'язувальні поліпептиди за даним винаходом можуть бути введені декілька разів. Інтервали між окремими дозами можуть бути щотижневими, щомісячними або щорічними. Інтервали можуть також бути нерегулярними за показниками рівнів вимірювання модифікованого поліпептиду в крові або зв'язування антигену у хворого. У деяких методах дозування регулюється до досягнення концентрації модифікованого зв'язувального поліпептиду в плазмі 10 1-1000 мкг/мл і в деяких методах 25-300 мкг/мл. Альтернативно, зв'язувальні поліпептиди можна вводити у вигляді композиції з підтримуваним вивільненням, у цьому випадку потрібно менш часте введення. Для антитіл дозування і частота варіюються залежно від періоду напівжиття антитіла в організмі хворого. Загалом, гуманізовані антитіла демонструють найбільш довгий період напівжиття, потім йдуть химерні антитіла й антитіла, що не належать до людини.

15 Дозування і частота введення можуть варіюватися залежно від того, чи є лікування профілактичним або терапевтичним. При профілактичному застосуванні композиції, що містять антитіла за даним винаходом або їх суміш, вводять хворому вже не в стані захворювання, щоб підвищити стійкість хворого. Така кількість визначена як "профілактично ефективна доза". У цьому варіанті застосування точні кількості також залежать від стану здоров'я хворого і загального імунітету, але звичайно знаходяться в діапазоні від 0,1 до 25 мг на дозу, особливо від 0,5 до 2,5 мг на дозу. Відносно низьку дозу вводять при відносно нечастих інтервалах протягом тривалого періоду часу. Деякі хворі продовжують одержувати лікування протягом усього життя, що залишилося. При терапевтичному застосуванні відносно високі дози (наприклад, від приблизно 1 до 400 мг/кг антитіла на дозу, з дозами від 5 до 25 мг, більш широко використовуваними для радіоімунокон'югатів, і з більш високими дозами для модифікованих антитіл з ліками цитотоксином) з відносно короткими інтервалами іноді вимагаються доти, поки не зменшується або не припиняється прогресія захворювання і, переважно, поки у хворого не з'являється часткове або повне полегшення симптомів захворювання. Після цього хворому можна вводити дози в профілактичному режимі.

30 Зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям необов'язково можуть бути введені в сполученні з іншими агентами, що ефективні в лікуванні порушення або стану у потребуючих лікування (наприклад, профілактичного або терапевтичного). Ефективні дози для однократного лікування (тобто терапевтично ефективні кількості) мічених ^{90}Y модифікованих антитіл за даним розкриттям знаходяться в діапазоні від приблизно 5 до приблизно 75 мКі, більш переважно між 35 приблизно 10 і приблизно 40 мКі. Ефективні дози ^{131}I -модифікованих антитіл для однократного лікування, що не руйнують кістковий мозок, лежать у діапазоні між приблизно 5 і приблизно 70 мКі, більш переважно між приблизно 5 і приблизно 40 мКі. Ефективні дози ^{131}I -мічених антитіл для однократного лікування, що руйнують кістковий мозок (тобто може знадобитися трансплантація аутологічного кісткового мозку), лежать у діапазоні між приблизно 30 і 40 приблизно 600 мКі, більш переважно між приблизно 50 і приблизно менше 500 мКі. При сполученні з химерними антитілами, завдяки їх більш тривалому періоду напівжиття в кровотоку в партнерстві з мишачими антитілами, ефективні дози химерних антитіл, мічених йодом-131, для однократного лікування без руйнування кісткового мозку знаходяться в діапазоні від 45 приблизно 5 до приблизно 40 мКі, більш переважно менше приблизно 30 мКі. Критерії візуалізації, наприклад для мітки ^{111}In , як правило, складають менше приблизно 5 мКі.

У той час як зв'язувальні поліпептиди можна вводити, як описано безпосередньо вище, варто підкреслити, що в інших варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди можуть бути введені в іншому здоровим хворим як терапія першої лінії. У таких варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди можуть бути введені хворим, що мають нормальні або середні резерви червоного кісткового мозку, і/або хворим, що не піддавалися і не піддаються іншим видам терапії. При застосуванні в даному документі введення модифікованих антитіл або їх фрагментів у поєднанні або в сполученні з додатковою терапією означає послідовне, спільне, співпадаюче, супутне, супровідне або одночасне введення або застосування додаткової терапії й описаних антитіл. Фахівцям у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що введення або застосування різних компонентів сумісної терапевтичної схеми може бути розраховане за часом для підвищення загальної ефективності лікування. Наприклад, хіміотерапевтичні агенти можуть бути введені у вигляді стандартних добре відомих курсів лікування з наступним введенням у межах декількох тижнів радіоімунокон'югатів за даним винаходом. З іншого боку, зв'язані з цитотоксином зв'язувальні поліпептиди можна вводити внутрішньовенно з наступним спрямованим на пухлину зовнішнім пучком випромінювання. У ще одних варіантах здійснення 60

модифікований зв'язувальний поліпептид можна вводити одночасно з одним або декількома вибраними хіміотерапевтичними агентами при одному відвідуванні лікарні. Фахівець у даній галузі техніки (наприклад, досвідчений онколог) легко може розрізнити ефективні комбіновані терапевтичні схеми без зайвого експериментування на основі вибраної додаткової терапії і указань даного опису.

У зв'язку з цим варто мати на увазі, що сполучення зв'язувальних поліпептидів і хіміотерапевтичного агента може вводитися в будь-якому порядку й у межах будь-якого періоду часу, що забезпечує терапевтичну перевагу для хворого. Це означає, що хіміотерапевтичний агент і зв'язувальні поліпептиди можна вводити в будь-якому порядку або одночасно. В окремих варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди згідно з даним винаходом можуть бути введені хворим, що раніше піддавалися хіміотерапії. У ще одних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди і хіміотерапевтичні агенти можуть вводитися по суті одночасно або паралельно. Наприклад, хворий може одержувати зазначені зв'язувальні поліпептиди при проходженні курсу хіміотерапії. У переважних варіантах здійснення модифіковане антитіло може бути введене в межах одного року після будь-якого хіміотерапевтичного агента або лікування. В інших переважних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди можуть бути введені в межах 10, 8, 6, 4 або 2 місяців після будь-якого хіміотерапевтичного агента або лікування. У ще одних переважних варіантах здійснення зв'язувальний поліпептид може бути введений у межах 4, 3, 2 або 1 тижня після будь-якого хіміотерапевтичного агента або лікування. У ще одних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди можуть бути введені в межах 5, 4, 3, 2 або 1 дня після вибраного хіміотерапевтичного агента або лікування. Крім того, варто розуміти, що ці два агенти або препарати можуть бути введені хворому у межах не більше декількох годин або хвилин (тобто, по суті, одночасно).

Крім того, варто розуміти, що зв'язувальні поліпептиди за даним розкриттям можуть бути використані в сполученні або в поєднанні з будь-яким хіміотерапевтичним агентом або агентами (наприклад, щоб забезпечити комбінований терапевтичний режим), що виключає, знижує, інгібує або контролює ріст пухлинних клітин *in vivo*. Приклади хіміотерапевтичних агентів, що сумісні з даним розкриттям, включають алкілувальні агенти, алкалоїди барвінку (наприклад, вінкрисдин і вінбластин), прокарбазин, метотрексат і преднізон. Сполучення чотирьох ліків МОРР (мехлетамін (азотистий іприт), вінкрисдин (онковін), прокарбазин і преднізон) є дуже ефективним при лікуванні різних типів лімфоми і включає переважний варіант здійснення даного винаходу. У стійких до МОРР хворих можуть бути використані АВВД (наприклад, адриаміцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин), СhIVPP (хлорамбуцил, вінбластин, прокарбазин і преднізон), СABS (ломустин, доксорубіцин, блеоміцин і стрептозотоцин), МОРР плюс АВВД, МОРР плюс АВВ (доксорубіцин, блеоміцин і вінбластин) або ВСVPP (кармустин, циклофосфамід, вінбластин, прокарбазин і преднізон). Arnold S. Freedman and Lee M. Nadler, *Malignant Lymphomas*, in HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al, eds., 13th ed. 1994), і DeVita V. T. et al. (1997) і цитовані там посилання для стандартного дозування і режиму. Ці способи лікування можуть бути використані без змін або змінені за необхідності для конкретного хворого в сполученні з одним або більше зв'язувальними поліпептидами за даним розкриттям, як описано в даному документі.

Додаткові схеми, які можна використовувати в контексті даного винаходу, включають використання одиночних алкілувальних агентів, таких як циклофосфамід або хлорамбуцил, або сполучень, таких як СVP (циклофосфамід, вінкрисдин і преднізон), СНОР (СVP і доксорубіцин), С-МОРР (циклофосфамід, вінкрисдин, преднізон і прокарбазин), САР-ВОР (СНОР плюс прокарбазин і блеоміцин), т-ВАСОД (СНОР плюс метотрексат, блеоміцин і лейковорин), ProMACE-МОРР (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид і лейковорин плюс стандартний МОРР), ProMACE-СутаВОМ (преднізон, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид, цитарабін, блеоміцин, вінкрисдин, метотрексат і лейковорин) і МАСОР-В (метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкрисдин, фіксована доза преднізону, блеоміцин і лейковорин). Фахівці в даній галузі техніки легко можуть визначити стандартні дози і схеми для кожного з цих режимів. СНОР також сполучають із блеоміцином, метотрексатом, прокарбазинном, азотистим іпритом, цитозинарабінозидом і етопозидом. Інші сумісні хіміотерапевтичні агенти включають, але не обмежуються цим, 2-хлордезоксіаденозин (2-CDA), 2'-дезоксикоформіцин і флударабін.

Для хворих з проміжною стадією і високою стадією NHL, що не досягають ремісії або мають рецидив, використовується терапія порятунку. При терапії порятунку використовують ліки, такі як цитозинарабінозид, карбоплатин, цисплатин, етопозид і іфосфамід, одержувані окремо або в сполученні. При рецидивуючих або агресивних формах деяких пухлинних захворювань часто використовуються наступні протоколи: IMVP-16 (іфосфамід, метотрексат і етопозид), MIME

(метил-gag, іфосфамід, метотрексат і етопозид), DNAP (дексаметазон, високі дози цитарабіну і цисплатин), ESHAP (етопозид, метилпреднізолон, HD цитарабін, цисплатин), CEP(B) (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин, преднізон і блеоміцин) і CAMP (ломустин, мітоксантрон, цитарабін і преднізон), кожний з добре відомими рівнями дозування і схемами.

5 Кількість хіміотерапевтичного агента, використовуюваного в сполученні з модифікованими антитілами за даним винаходом, може варіюватися залежно від суб'єкта або може бути введена відповідно до того, що відомо в даній галузі техніки. Див., наприклад, Bruce A. Chabner et al., Antineoplastic Agents, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed. 1996).

10 Як обговорювалося раніше, зв'язувальні поліпептиди за даним винаходом, їх імунореактивні фрагменти або їх рекомбінантні білки можна вводити у фармацевтично ефективній кількості для лікування порушень у ссавців *in vivo*. У зв'язку з цим варто розуміти, що розкриті зв'язувальні поліпептиди можна складати так, щоб полегшувати введення і сприяти стабільності активного агента.

15 Переважно, фармацевтичні композиції відповідно до даного винаходу включають фармацевтично прийнятний, нетоксичний, стерильний носій, такий як фізіологічний розчин, нетоксичні буфери, консерванти тощо. Для цілей даної заявки фармацевтично ефективна кількість модифікованого зв'язувального поліпептиду, його імунореактивного фрагмента або його рекомбінантного білка, кон'югованого або не кон'югованого з терапевтичним агентом, повинна підтримуватися до середньої кількості, достатньої для досягнення ефективного зв'язування з антигеном і досягнення переваги, наприклад, у поліпшенні симптомів захворювання або порушення або у виявленні речовини або клітини. У випадку пухлинних клітин модифікований зв'язувальний поліпептид може переважно мати здатність до взаємодії з вибраними імунореактивними антигенами на пухлинних або імунореактивних клітинах і забезпечувати збільшення загибелі цих клітин. Звичайно, фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути введені у вигляді однієї або декількох доз для забезпечення фармацевтично ефективною кількості модифікованого зв'язувального поліпептиду.

Відповідно до обсягу даного винаходу зв'язувальні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути введені людині або іншій тварині відповідно до вищезгаданих способів лікування в кількості, достатній для одержання терапевтичного або профілактичного ефекту. Зв'язувальні поліпептиди за винаходом можна вводити такій людині або іншій тварині в звичайній дозованій формі, одержаній шляхом об'єднання антитіла за винаходом зі звичайним фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем відповідно до відомих способів. Фахівцям у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що форма і характер фармацевтично прийнятного носія або розріджувача диктується кількістю активного інгредієнта, з яким він повинен бути об'єднаний, шляхом введення й іншими добре відомими змінними. Фахівцям у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що суміш, яка містить один або більше видів зв'язувальних поліпептидів, описаних у даному документі, може пропонуватися як особливо ефективна.

V. Експресія зв'язувальних поліпептидів

40 В одному аспекті даний винахід стосується полінуклеотидів, кодуючих зв'язувальні поліпептиди, описані в даному документі. Пропонується також спосіб одержання зв'язувального поліпептиду, який включає експресію цих полінуклеотидів.

45 Полінуклеотиди, кодуючі зв'язувальні поліпептиди, описані в даному документі, як правило, вставляють у експресійний вектор для введення в клітини-хазяїни, що можуть бути використані для одержання бажаної кількості заявлених антитіл або їх фрагментів. Відповідно, у деяких аспектах даний винахід стосується експресійних векторів, що включають полінуклеотиди, розкриті в даному документі, і клітин-хазяїнів, що включають ці вектори і полінуклеотиди.

Термін "вектор" або "експресійний вектор" використовується в даному документі в описі і формулі винаходу для позначення векторів, використовуваних відповідно до даного винаходу як носій для введення й експресії бажаного гена в клітині. Як відомо фахівцям у даній галузі техніки, такі вектори легко можуть бути вибрані з групи, що складається з плазмід, бактеріофагів, вірусів і ретровірусів. Загалом, вектори, сумісні з даним винаходом, можуть включати маркер селекції, відповідні сайти рестрикції для полегшення клонування бажаного гена і здатності до входження і/або реплікації в еукаріотичних або прокаріотичних клітинах.

55 Численні системи експресійних векторів можуть бути використані з метою даного винаходу. Наприклад, один клас векторів використовує елементи ДНК, що походять від вірусів тварин, таких як вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус полііоми, аденовірус, вірус коров'ячої віспи, бакуловірус, ретровіруси (SV, MMTV або MOMLV) або вірус SV40. Інші класи передбачають використання поліцистронних систем з внутрішніми сайтами зв'язування рибосом. Крім того, 60 клітини, що інтегрували ДНК у свої хромосоми, можуть бути відібрані шляхом введення одного

або більше маркерів, які дозволяють відбирати трансфіковані клітини-хазяїни. Маркер може забезпечити прототрофію ауksотрофного хазяїна, біоцидну стійкість (наприклад, до антибіотиків) або стійкість до важких металів, таких як мідь. Ген маркера селекції може бути або
 5 за допомогою котрансформації. Для оптимального синтезу мРНК можуть бути також необхідні додаткові елементи. Ці елементи можуть включати сигнальні послідовності, сигнали сплайсингу, а також промотори, енхансери і сигнали термінації транскрипції. В особливо переважних варіантах здійснення клонівані гени варіабельних областей вставляють у експресійний вектор разом з синтетичною константною областю важкого і легкого ланцюгів генів
 10 (переважно людини), як описано вище.

В інших переважних варіантах здійснення зв'язувальні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути експресовані за допомогою поліцистронних конструктів. У таких системах експресії множинні генні продукти, що представляють інтерес, такі як важкі і легкі ланцюги антитіл, можуть бути одержані з одного поліцистронного конструкта. Ці системи переважно використовують внутрішній сайт посадки рибосом (IRES) для забезпечення відносно високих рівнів поліпептидів за даним винаходом в еукаріотичних клітинах-хазяїнах. Сумісні послідовності IRES описані в патенті США № 6193980, що включений у даний документ як посилання. Фахівцям у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що такі експресійні системи можуть бути використані для ефективного одержання повного спектра поліпептидів, розкритих у даній заявці.
 15 20

Звичайно після одержання вектора або послідовності ДНК, кодуєчих антитіло або його фрагмент, експресійний вектор може бути введений у придатну клітину-хазяїна. Це означає, що клітини-хазяїни можуть бути трансформовані. Введення плазміди в клітину-хазяїна може бути здійснене різними методами, добре відомими фахівцям у даній галузі техніки. Вони включають, але не обмежуються цим, трансфекцію (у тому числі електрофорез і електропорацію), злиття протопластів, осадження фосфатом кальцію, злиття клітин з зовнішньою ДНК, мікроін'єкцію й інфікування інтактним вірусом. Див., Ridgway A. A. G. "Mammalian Expression Vectors", Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Найбільш переважним введенням плазміди в хазяїна є введення за допомогою електропорації.
 25 30 Трансформовані клітини вирощують в умовах, придатних для одержання легких ланцюгів і важких ланцюгів, і аналізують відносно синтезу білка важкого і/або легкого ланцюга. Приклади методів аналізу включають імуноферментний аналіз (ELISA), радіоімуноаналіз (RIA) або аналіз за допомогою сортування флуоресцентно активованих клітин (FACS), імуногістохімію тощо.

При застосуванні в даному документі, термін "трансформація" повинен використовуватися в широкому розумінні для позначення введення ДНК у реципієнтну клітину-хазяїна, що змінює генотип і, отже, приводить до змін у клітині-реципієнті.
 35

По тих же причинах "клітини-хазяїни" належать до клітин, трансформованих векторами, сконструйованими з використанням методів рекомбінантних ДНК і кодуєчими щонайменше один гетерологічний ген. В описах методів виділення поліпептидів з рекомбінантних хазяїнів, терміни "клітина" і "клітинна культура" використовуються як взаємозамінні для позначення джерела антитіл, якщо ясно не зазначене інше. Іншими словами, одержання поліпептиду з "клітин" може означати або з осаджених цілих клітин, або з клітинної культури, що містить як середовище, так і суспендовані клітини.
 40

В одному варіанті здійснення лінія клітин-хазяїнів, використовувана для експресії антитіла, походить від ссавців; фахівці в даній галузі техніки можуть визначити конкретні лінії клітин-хазяїнів, що найкраще придатні для експресії в них необхідного генного продукту. Приклади ліній клітин-хазяїнів включають, але не обмежуються цим, лінії DG44 і DUXB11 (лінії яєчника китайського хом'ячка, DHFR-мінус), HeLa (раку шийки матки людини), CV1 (лінію нирок мавпи), COS (похідне CV1 з Т-антигеном SV40), R1610 (фібробластів китайського хом'ячка) BALBC/3T3 (фібробластів мишей), HAK (лінію нирок хом'ячка), SP2/O (мишачу мієлому), BFA-IcIBPT (ендотеліальних клітин великої рогатої худоби), RAJI (лімфоцитів людини), 293 (нирки людини). В одному варіанті здійснення пропонується лінія клітин для зміненого глікозилування, наприклад фукозилування, для експресії в ній антитіла (наприклад, PER.C6.RTM. (Crucell) або клітинні лінії CHO з FUT8-нокаутом (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). В одному варіанті здійснення можуть бути використані клітини NS0. Клітини CHO є особливо переважними. Лінії клітин-хазяїнів, як правило, доступні з комерційних джерел, американської колекції тканинних культур або з опублікованої літератури.
 45 50 55

Одержання *in vitro* дозволяє масштабувати процес до даних великих кількостей потрібних поліпептидів. Методи культивування клітин ссавців в умовах тканинного культивування відомі в даній галузі техніки і включають гомогенну суспензійну культуру, наприклад в аероліфтному
 60

реакторі або в реакторі з безупинним перемішуванням, або іммобілізовані або інтегровані клітинні культури, наприклад у порожні волокна, мікрокапсули, на агарозні мікрогранули або керамічні картриджі. Якщо необхідно і/або бажано, розчини поліпептидів можуть бути очищені звичайними методами хроматографії, наприклад гель-фільтрацією, іонообмінною хроматографією, хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі і/або (імуно)афінною хроматографією.

Гени, кодуєчі зв'язувальні поліпептиди за винаходом, також можуть бути експресовані в клітинах, що не належать до ссавців, таких як бактерії або дріжджі, або в рослинних клітинах. У зв'язку з цим варто мати на увазі, що різні одноклітинні мікроорганізми, що не належать до ссавців, такі як бактерії, також можуть бути трансформовані; тобто ті з них, що здатні до вирощування в культурах або до ферментації. Бактерії, що сприйнятливі до трансформації, включають членів ентеробактерій, таких як штами *Escherichia coli* або *Salmonella*; *Bacillaceae*, такі як *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* і *Haemophilus influenzae*. Крім того, варто розуміти, що, при експресії в бактеріях, поліпептиди можуть ставати частиною тілець включення. Поліпептиди повинні бути виділені, очищені і потім зібрані у функціональні молекули.

Крім прокаріот можуть бути також використані еукаріотні мікроби. *Saccharomyces cerevisiae*, або звичайні пекарські дріжджі, є найбільш часто використовуваними серед еукаріотних мікроорганізмів, хоча загальнодоступним є ряд інших штамів. Для експресії в *Saccharomyces* звичайно використовується, наприклад, плазміда YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Ця плазміда вже містить ген TRP1, що забезпечує селективним маркером мутантний штам дріжджів з відсутністю здатності рости в триптофані, наприклад, ATCC No. 44076 або PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Наявність ушкодження TRP1 як характеристики геному дріжджової клітини-хазяїна потім забезпечує ефективне середовище для детектування трансформації по росту за відсутності триптофану.

Приклади

Даний винахід далі ілюструється наступними прикладами, що не повинні бути витлумачені як подальше обмеження. Зміст списку послідовностей, фігур і всі посилання, патенти й опубліковані патентні заявки, наведені в даній заявці, включені в неї як посилання.

Приклад 1. Дизайн, одержання і характеристика мутантних гіперглікозилованих антитіл 2С3 проти CD-52

Множинні мутації з гіперглікозилюванням були створені у важкому ланцюзі антитіла 2С3 проти CD-52 з метою додавання об'ємної групи до інтерфейсу взаємодії (наприклад, сайта зв'язування FcRn для модуляції фармакокінетики антитіла), для модуляції ефекторної функції антитіла шляхом зміни його взаємодії з FcγR або для введення нової хімічної модифікації підпослідовності сайта поперечного зшивання для кон'югації ефекторної частини, включаючи, але не обмежуючись цим, кон'югацію ліків, токсинів, цитотоксичних агентів і радіонуклідів. Гіперглікозиловані мутанти 2С3 представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Гіперглікозовані мутанти 2С3 проти CD-52

Мутація	Необхідна перевага	Застосування
A114N	Глікозилювання в Asn-Ser-Thr	1) Контроль 2) Кон'югація ефекторної частини
Y436T	Глікозилювання в Asn434 Інгібування зв'язування FcRn	1) Трансплантація і інші показання, які вимагають короткого періоду напівжиття
Y436S	Глікозилювання в Asn434 Інгібування зв'язування FcRn	1) Трансплантація і інші показання, які вимагають короткого періоду напівжиття
S440N	Глікозилювання в Asn-Leu-Ser	1) Контроль 2) Кон'югація ефекторної частини
S442N	Глікозилювання в Asn-Leu-Ser	1) Контроль 2) Кон'югація ефекторної частини
Додавання NGT до С-кінця	Глікозилювання	1) Контроль 2) Кон'югація ефекторної частини
S298N/Y300S	Глікозилювання в Asn298 Зниження ефекторної функції	1) Зниження ефекторної функції 2) Кон'югація ефекторної частини

1А. Створення гіперглікозилованих мутантів антитіла 2С3 проти CD-52

Мутація A114N, що позначається на основі системи нумерації Кебата, була введена в домен CH1 антитіла 2C3 за допомогою мутагенної ПЛР. Для створення повнорозмірного антитіла домен VH плюс мутантний залишок A114N вставляли незалежним від лігування клонуванням (LIC) у вектор рЕНТР-LIC-IgG1, кодуєчий домени 1-3 CH антитіла. Всі інші мутації вводили в рЕНТР-LIC-IgG1 шляхом сайт-направленого мутагенезу за допомогою набору QuikChange для сайт-направленого мутагенезу (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). VH WT 2C3 клонували в мутантні вектори за допомогою LIC. Повнорозмірних мутантів клонували в експресійний вектор рСЕР4(-E+I)Dest клонуванням Gateway. Мутації Fc позначали на основі системи нумерації EU. Мутації підтверджували секвенуванням ДНК. Амінокислотні послідовності важких і легких ланцюгів WT 2C3 і мутантних важких ланцюгів 2C3 наведені в таблиці 4. Мутантні амінокислоти виділені сірим кольором і консенсусні сайти-мішені глікозилування, створені за допомогою мутації, підкреслені.

Таблица 4

Амінокислотні послідовності антитіл 2C3 проти CD-52

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
1	Легкий ланцюг WT проти CD-52	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLLQKPGQSPQRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRL EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
2	Важкий ланцюг WT проти CD-52	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	Важкий ланцюг A114N проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
4	Важкий ланцюг Y436S проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNLSY LQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHSTQKSLSLSPGK
5	Важкий ланцюг S440N проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNLSY LQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	Важкий ланцюг S442N проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNLSY LQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	Важкий ланцюг NGT проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNLSY LQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKNGT

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
8	Важкий ланцюг S298N/Y300S проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDS SKNS LYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHT FPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYN NTSR VVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Мутанти і контроль WT трансфікували в клітини HEK293-EBNA у форматі 6-ямкового планшета. Як показано на фіг. 9, виявлюваний рівень експресії складав ~0,1 мкг/мл при аналізі за допомогою SDS-PAGE і Вестерн-блотингу. Експресію мутантів у кондиційних середовищах вимірювали також по захопленню протеїном А на Biotin. Концентрацію визначали з використанням відгуку дисоціації через 6 хвилин після ін'єкції в іммобілізований протеїн А. Продуковане CHO WT 2C3, серійно розведене в середовищах від 90 мкг/мл до 1,5 нг/мл, використовували як стандартну криву. Концентрації розраховували аж до ~0,2 мкг/мл за допомогою каліброваної кривої з використанням 4-параметричної підгонки. Як показано на фіг. 9, відносні рівні експресії були низькими й загалом відповідали результатам Вестерн-блотингу.

1B. Верифікація гіперглікозилювання

Для визначення, чи були введені додаткові сайти глікозилювання шляхом мутації, мутант 2C3 і білки дикого типу обробляли універсальним деглікозилюючим ферментом PNG-азою F, і зразки білка аналізували за допомогою SDS-PAGE і Вестерн-блотингу. Як показано на фіг. 10, тільки мутант A114N мав збільшену уявну молекулярну масу, що вказує на присутність додаткового N-зв'язаного вуглеводу.

Препарати антитіл одержували в невеликому масштабі для очищення мутантів 2C3 для подальшої перевірки введення сайту глікозилювання. Як показано на фіг. 11, за допомогою SDS-PAGE підтверджено, що тільки мутант A114N мав введені додаткові сайти глікозилювання.

1C. Зв'язувальні властивості мутантів 2C3 проти CD-52

Віасоге використовували для порівняння зв'язувальних властивостей очищених білків. FcRn-НРС4 миші й очищений SEC FcRn-НРС4 людини іммобілізували на чипі CM5 через зв'язування аміну. Кожне антитіло розводили до 200, 50 і 10 нМ і наносили поверх іммобілізованих рецепторів Fc. Camrath, продуковані в CHO WT 2C3, і оброблені DEPC Camrath включали як позитивні і негативні контролю. Як показано на фіг. 13, мутант Y436S виявляв приблизно 2-кратне зниження зв'язування з FcRn людини. Цікаво, що зв'язування цього мутанта з FcRn миші не було зачеплене. Жодна з інших мутацій 2C3 не здійснювала суттєвого впливу на зв'язування FcRn людини або миші.

Віасоге використовували для порівняння антигензв'язувальних властивостей очищених білків за допомогою аналізу Віасоге зв'язування пептиду 741 CD-52. Пептид 741 CD-52 і контрольний пептид 777 іммобілізували на чипі CM5. Антитіла серійно розводили в 2 рази від 60 до 0,2 нМ у HBS-EP і вводили в двох паралелях протягом 3 хв. з наступною дисоціацією протягом 5 хв. у буфері при швидкості потоку 50 мкл/хв. Лот GLD52 17200-084 включали як контроль. Поверхню регенерували 1 пульсом 40 мМ HCl. Використовували модель 1:1 для підгонки 7,5 до кривих 0,2 нМ. Як показано на фіг. 16, мутант A114N мав трохи більш високу афінність зв'язування CD-52, у той час як мутант NGT мав трохи більш високу афінність у порівнянні з іншою частиною мутантів у цьому аналізі. Аналіз Віасоге зв'язування пептиду 741 CD-52 повторювали з білком, очищеним у більш масштабній кількості. Як показано на фіг. 17, мутант A114N характеризувався зв'язуванням пептиду CD-52, порівняним з 2C3 WT.

1D. Характеристика заряду мутанта A114N

Ізоелектричне фокусування (IEF) проводили з метою охарактеризувати заряд мутантів 2C3. Очищений білок пропускали через іммобілізований градієнт рН (рН 3-10) акриламідних (IPG) гелів. Як показано на фіг. 18A, A114N, як установлено, мав більше негативних зарядів, ймовірно через залишки сілової кислоти. Інтактні дані MS підтвердили складну структуру з сіловими

кислотами в мутанта A114N. На відміну від цього, 2C3 WT, як показано, мав G0F і G1F як домінуючі види глікозилювання (фіг. 18C і 18D, відповідно).

Приклад 2. Одержання гіперглікозилованих мутантів у каркасах декількох антитіл

5 На доповнення до антитіла 2C3 проти CD-52, мутація A114N була зроблена в каркасах декількох інших антитіл для підтвердження того, що унікальний сайт гіперглікозилювання може бути введений у неспоріднені послідовності варіабельних доменів важкого ланцюга. Гіперглікозиловані мутанти проти TEM1, проти FAP і проти HER2 представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Мутанти A114N і/або S298N, створені в декількох каркасах неспоріднених антитіл

Мутація	Антитіло	Бажана перевага	Застосування
A114N	Проти TEM1 Проти FAP Проти Her2	Додатковий сайт глікозилювання біля коліна шарніра важкого ланцюга для сайт-специфічної кон'югації, опосередкованої вуглеводами	1) Контроль 2) Кон'югація аміноокситоксинів через експоновану сіалову кислоту або групу галактози (SAM або GAM)
S298N/ T299A/ Y300S (NNAS)	Проти Her2	Переміщення глікозилювання з Asn297 на сконструйований Asn298. Очікується, що експозиція з розчинником і складні вуглеводи у S298N нададуть сайт кон'югації і засіб для видалення ефекторної функції	1) Кон'югація аміноокситоксинів через експоновану сіалову кислоту або групу галактози (SAM або GAM) 2) Знижена ефекторна функція
A114N/ NNAS	Проти Her2	Можливість підвищення виходу кон'югації з двома сайтами кон'югації	1) Контроль 2) Кон'югація аміноокситоксинів через експоновану сіалову кислоту або групу галактози (SAM або GAM)

10 2A. Створення гіперглікозилованих мутантів антитіл проти TEM1 і проти FAP

Мутацію A114N, позначену на основі системи нумерації Кебата, вводили в домен CH1 антитіла проти TEM1 і проти FAP за допомогою мутагенної ПЛР. Для створення повнорозмірного антитіла мутантний VH плюс залишок 114 вставляли незалежним від лігування клонуванням (LIC) у вектор pENTR-LIC-IgG1, кодуючий домени 1-3 CH антитіла. Повнорозмірних мутантів 15 потім клонували в експресійний вектор pCER4(-E+)Dest клонуванням Gateway. Мутації підтверджували секвенуванням ДНК. Амінокислотні послідовності антитіла проти TEM1 дикого типу і мутантних важких і легких ланцюгів наведені в таблиці 6. Мутантні амінокислоти виділені сірим кольором і консенсусні сайти-мішені глікозилювання, створені за допомогою мутації, 20 підкреслені.

Амінокислотні послідовності антитіл проти TEM1 і проти FAP

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
9	Легкий ланцюг WT проти TEM1 (клон #187)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	Важкий ланцюг WT проти TEM1 (клон #187)	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLEIYIYYTGSAINPSLQSRVTISVDTS KNQFSLKLNSTAAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	A114N проти TEM1	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLEIYIYYTGSAINPSLQSRVTISVDTS KNQFSLKLNSTAAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Мутанти і контроль дикого типу трансфікували в клітини HEK293-EBNA у форматі потрібних флаконів і очищали на колонках протеїну A HiTrap (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). При аналізі за допомогою A280 на спектрофотометрі NanoDrop, експресія антитіл проти FAP A114N і проти FAP A114C складала приблизно 3 мкг/мл і приблизно 1 мкг/мл, відповідно. Експресія антитіла A114N проти TEM1 складала приблизно 0,04 мкг/мл.

2B. Верифікація гіперглікозилювання

Для підтвердження того, що додатковий сайт глікозилювання був введений у мутанти A114N, очищений білок від мутантів A114N аналізували у відновному SDS-PAGE разом з контрольним білком дикого типу. Один додатковий сайт глікозилювання повинен додавати 2000-3000 дальтон до молекулярної маси важкого ланцюга. Як показано на фіг. 20, SDS-PAGE показав, що смуги важких ланцюгів мутантів A114N проти FAP і проти TEM1 мали збільшену уявну молекулярну масу, що відповідає успішному введенню додаткового сайту глікозилювання в обидва антитіла.

2C. Створення гіперглікозилюваних мутантів антитіла проти HER2

Антитіла проти Her2 A114N, Her2 A114N/NNAS і Her2 WT були створені незалежними від лігування клонуванням. Домен VH герцептину синтезували й ампліфікували ПЛР з двома сумісними з LIC наборами праймерів, або WT, або які несуть мутацію A114N. Для одержання повнорозмірного антитіла ампліфіковані вставки VH (WT або A114N) клонували в два вектори pENTR, кодуєчі домени 1-3 CH, pENTR-LIC-IgG1 WT і pENTR-LIC-IgG1 NNAS, з одержанням трьох повнорозмірних мутантів (A114N, NNAS, A114N/NNAS) і контролю WT як вихідних клонів на pENTR. Цих мутантів клонували в експресійний вектор pCEP4(-E+I)Dest за допомогою

клонування Gateway. Мутації підтверджували секвенуванням ДНК. Амінокислотні послідовності антитіла проти Her2 дикого типу і мутантних важкого і легкого ланцюгів наведені в таблиці 7. Мутантні амінокислоти виділені сірим кольором і консенсусні сайти-мішені глікозилування, створені за допомогою мутації, підкреслені.

5

Таблица 7

Амінокислотні послідовності антитіл проти HER-2

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
12	Легкий ланцюг WT проти Her2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	Важкий ланцюг WT проти Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Важкий ланцюг A114N проти Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLVTVSS AST KGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Важкий ланцюг NNAS проти Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN NAS RVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
16	Важкий ланцюг A114N/NNAS проти Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGGQGLVTVSSNSTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNNSR VSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

2D. Експресія гіперглікозилизованого мутанта антитіла A114N проти Her2

Антитіло A114N проти Her2 і конструкти дикого типу трансфікували ліпофектаміном-2000 (відношення реагенту до ДНК 2,5:1) і XtremeGene HP (відношення реагенту до ДНК 3:1) у клітини HEK293-EBNA у 12 потрібних флаконах. Вимірювання Octet аліквот з кондиційних середовищ (СМ) на 3 день показало, що експресія білка в 6 флаконах відповідає як для ліпофектаміну-2000, так і для XtremeGene HP. Як показано в таблиці 8, загальна ефективність трансфекції була приблизно на 30% вище у випадку XtremeGene HP. Кондиційні середовища, зібрані на 3-й день, об'єднували у випадку обох варіантів трансфекції й очищали за допомогою колонки з протеїном А. Вимірювання Octet виявило 1,8 мкг/мл антитіла в імітаційному середовищі, що містить сироватку, в порівнянні з 0 мкг/мл у середовищах, що не імітують сироватку.

Таблиця 8

Експресія гіперглікозилизованого мутанта A114N проти Her2

		Ліпофектамін-2000	XtremeGene HP
Очищений білок з колонки протеїн А	Концентрація (мг/мл)	1,72	3,18
	Об'єм (мл)	3,5	3,5
	Сумарний білок (мг)	6,02	11,13
Білок з заміною буфера	Концентрація (мг/мл)	15,59	16,86
	Об'єм (мл)	0,2	0,36
	Сумарний білок (мг)	3,1	6,07
	% відкриття	51,8	54,5

Кондиційні середовища на 6-й день збирали й очищали окремо для кожного з варіантів трансфекції. Для обох елюатів проводили заміну буфера окремо на PBS, рН 7,2, і концентрували в ~15 разів з використанням колонок Amicon-4 (з 50 кДа відсіканням). У СМ на 6-й день виявлений більш високий рівень експресії в порівнянні з СМ на 3-й день. Як показано в таблиці 8, сумарно 3 мг A114N герцептину з концентрацією 15,59 мг/мл (при трансфекції за допомогою ліпофектаміну) і 6 мг герцептину A114N з концентрацією 16,86 мг/мл (при трансфекції за допомогою XtremeGene HP) одержували з кондиційних середовищ на 6-й день для додаткових наступних варіантів застосування, таких як кон'югація антитіло-ліки.

2E. Аналіз SDS-PAGE і HIC мутанта A114N проти Her2

Перед кон'югацією очищений герцептин A114N характеризували на SDS-PAGE і HIC (гідрофобної хроматографії). Як показано на фіг. 21, якість очищеного герцептину A114N визначена як придатна для представлених нижче варіантів застосування.

2F. Кон'югація зі сконструйованим глікозилюванням

Було показано, що: а) сайт глікозилювання введений в положення 114 по Кебату в антитілі проти TEM1; б) мутант A114N характеризувався гіперглікозилюванням важкого ланцюга, показаним за допомогою відновного SDS-PAGE; і с) гіперглікозилюваний мутант A114N мав складну вуглеводну структуру за даними інтактної РХ/МС, включаючи кінцеві сіалові кислоти і

5 галактозу, що ідеально придатні для кон'югації SAM і GAM. Для підтвердження того, що сконструйований сайт глікозилювання придатний для кон'югації, антитіло A114N проти TEM1 кон'югували з 5 кДа ПЕГ за допомогою амінооксигрупи. Як показано на фіг. 22, ПЕГ був успішно кон'югований з антитілом A114N проти TEM1 через амінооксидз'язок. Цей мутант також успішно одержаний на каркасах антитіл 2C3 проти FAP і проти CD-52 (не показано). Ці дані показують, що сайт глікозилювання в N114 придатний для кон'югації ефекторних фрагментів.

Приклад 3. Створення мутантів Fc S298N/Y300S

10 Розроблені і створені сконструйовані варіанти Fc, у яких новий сайт глікозилювання введений у положення Ser 298 по EU, що іде за природним сайтом Asn297. Глікозилювання в Asn297 або зберігали, або видаляли в результаті мутації. Мутації і бажані результати глікозилювання представлені в таблиці 9.

Таблиця 9

Стан глікозилювання різних варіантів антитіл

#	Мутація	Бажаний сайт глікозилювання	Застосування
17	N297Q	Без глікозилювання (agly)	Контроль Agly
18	T299A	Без глікозилювання (agly)	Контроль Agly, невідома ефекторна функція
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	Без глікозилювання в 297, але зі сконструйованим сайтом глікозилювання в 298	Знижена ефекторна функція; кон'югація через експоновані групи сіалової кислоти або галактози
20	S298N/T299A/Y300S (STY)	Без глікозилювання в 297, але зі сконструйованим сайтом глікозилювання в 298	Знижена ефекторна функція; кон'югація через експоновані групи сіалової кислоти або галактози
21	S298N/Y300S (SY)	Два потенційних сайти глікозилювання в 297 і 298; зміни патерна глікозилювання	Знижена ефекторна функція; кон'югація через експоновані групи сіалової кислоти або галактози
22	Дикий тип	297	Контроль

3A. Створення змінених варіантів глікозилювання антитіл H66 проти $\alpha\beta$ TCR

15 Мутації зроблені у важкому ланцюзі клону антитіла #66 проти $\alpha\beta$ -T-клітинного рецептора за допомогою QuikChange з використанням матриці pENTR_LIC_IgG1. Домен VH HEBE1 Δ ab IgG1 #66 ампліфікували з праймерами LIC перед клонуванням у мутантну pENTR_LIC_IgG1 або pENTR_LIC_IgG1 дикого типу за допомогою LIC для створення повнорозмірного мутанта або антитіла дикого типу. Субклонування перевіряли подвійним гідролізом за допомогою DraIII/XhoI з одержанням вставки розміром приблизно 1250 п.о. у успішних клонів. Цих повнорозмірних мутантів потім клонували в експресійний вектор, pCEP4(-E+I)Dest, за допомогою клонування Gateway. Мутації підтверджували секвенуванням ДНК. Амінокислотні послідовності важких і легких ланцюгів WT H66 проти $\alpha\beta$ TCR і важких ланцюгів мутантного H66 наведені в таблиці 10. Мутантні амінокислоти виділені сірим кольором і консенсусні сайти-мішені глікозилювання, створені за допомогою мутації, підкреслені.

Таблиця 10

Амінокислотні послідовності антитіл H66 проти $\alpha\beta$ TCR

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
23	Легкий ланцюг клону H66 проти $\alpha\beta$ TCR	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQ KPGQAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSTLTIS SLEPEDFAVYYCQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
24	Важкий ланцюг клону H66 проти $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK*
25	Важкий ланцюг клону H66 S298N/Y300S проти $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAK TKPREEQYNNLSRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK*
26	Важкий ланцюг клону H66 S298N/T299A/Y300S проти $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAK TKPREEQYNNLSRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK*
27	Важкий ланцюг клону H66 N297Q/S298N/Y300S проти $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAK TKPREEQYQNTLSRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK*

5 Мутант, дикий тип і два конструкти неглікозилованих контролів (HEBE1 Agly IgG4 і HEBE1 Δ ab IgG1 в pCEP4) трансфікували в клітини HEK293-EBNA у потрійних флаконах для експресії. Білки очищали з 160 мл кондиційних середовищ (CM) за допомогою 1 мл колонок протеїну А HiTrap (GE) з використанням багатоканального перистальтичного насоса. П'ять мікрограмів

кожного одержаного в результаті супернатанту аналізували на 4-20% Тріс-гліциновому відновному і невідновному гелях SDS-PAGE (див. фіг. 2). Важкі ланцюги неглікозилованих мутантів (N297Q, T299A і контролів Agly) мігрували далі (вістря стрілки), що узгоджується з втратою гліканів у цих антитіл. Важкі ланцюги сконструйованих глікозилованих антитіл (NSY, 5 STY, SY, *Δab* і контролю WT, стрілки), однак, мігрували подібно з контролем дикого типу. Цей результат узгоджується з існуванням сконструйованого сайту глікозилювання в положенні 298 по EU. Аналіз SEC-BEPX показав, що всі мутанти експресуються у вигляді мономерів.

3B. Аналіз глікозилювання за допомогою PX-MC

Сконструйовані варіанти Fc H66 IgG1 були частково відновлені за допомогою 20 mM DTT 10 при 37°C протягом 30 хв. Потім зразки аналізували за допомогою капілярної PX/MC у системі капілярної BEPX Agilent 1100, з'єднаної з гібридною системою QSTAR qq TOF (Applied Biosystems). Для аналізу даних використовували реконструкцію білків по Bayesian з базовою корекцією і комп'ютерним моделюванням у Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem). У мутанта антитіла H66 S298N/T299A/Y300S виявлений один сайт глікозилювання в амінокислоті 298 з 2-антенарними і 3-антенарними гліканами складного типу, виявленими як основні види поряд з G0F, G1F і G2F (див. фіг. 34). Цей змінений профіль глікозилювання узгоджується зі зсувом глікозилювання на N298 замість сайту глікозилювання дикого типу в N297.

3C. Зв'язувальні властивості мутантів антитіла проти $\alpha\beta$ TCR з Fc γ R1IIa і Fc γ RI людини з використанням Biacore

20 Biacore використовували для оцінки зв'язування з рекомбінантним людським Fc γ R1IIa (V158 і F158) і Fc γ RI. На всіх чотирьох проточних комірках на чипі CM5 іммобілізували антитіла проти HPC4 за допомогою стандартної процедури зв'язування аміну, наданої Biacore. Антитіла проти HPC4 розводили до 50 мкг/мл у 10 mM ацетаті натрію, pH 5,0, для реакції приєднання і вводили протягом 25 хв. при 5 мкл/хв. Приблизно 12000 RU антитіл було іммобілізовано на поверхні 25 чипа. Рекомбінантні Fc γ R1IIa-V158 і Fc γ R1IIa-F158 людини розводили до 0,6 мкг/мл у буфері для зв'язування (HBS-P з 1 mM CaCl₂) і вводили в проточні комірки 2 і 4, відповідно, протягом 3 хв. при 5 мкл/хв. для захоплення 300-400 RU рецептора на чипі проти HPC4. Для виявлення відмінностей між компонентами, що слабо зв'язуються, в три рази більше rhFc γ R1IIa захоплювалося на поверхні проти HPC4 у порівнянні зі звичайно використовуваним у даному 30 аналізі. Проточні комірки 1 і 3 використовували як референсні контролю. Кожне антитіло розводили до 200 нМ у буфері для зв'язування і вводили через усі чотири проточні комірки протягом 4 хв. з наступною 5 хв. дисоціацією в буфері. Поверхні регенерували 10 mM EDTO в буфері HBS-EP протягом 3 хв. при 20 мкл/хв. Результати цих експериментів показані на фіг. 3.

35 Biacore був також використаний для порівняння зв'язування Fc γ RI. Проводили заміну буфера антитіла проти тетра-His на 10 mM ацетат натрію, pH 4,0, використовуючи колонку Zeba Desalting, і розводили до 25 мкг/мл в ацетатному буфері для зв'язування аміну. На двох проточних комірках чипа CM5 іммобілізували ~9000 RU антитіла проти тетра-His після 20 хв. ін'єкції при 5 мкл/хв. Як і в попередньому експерименті, у десять разів більше Fc γ RI захоплювалося на поверхні з антитілами проти тетра-His для порівняння зразків зі слабким 40 зв'язуванням. Рекомбінантний Fc γ RI людини розбавляли до 10 мкг/мл у буфері для зв'язування HBS-EP і вводили в проточну комірку 2 протягом 1 хв. при 5 мкл/хв. для захоплення ~1000 RU рецептора на чипі проти тетра-His. Одну концентрацію антитіла, 100 нМ, вводили протягом 3 хв. при 30 мкл/хв. через захоплення рецептор і контрольну поверхню. Потім простежували дисоціацію протягом трьох хвилин. Поверхню потім регенерували двома 30-секундними 45 ін'єкціями 10 mM гліцину, pH 2,5, при 20 мкл/хв. Результати цих експериментів представлені на фіг. 4.

Ці результати демонструють різке зниження зв'язування мутантів зі сконструйованим глікозилюванням з Fc γ R1IIa або Fc γ RI. H66 S298N/T299A/Y300S, зокрема, майже повністю припиняє зв'язування з обома рецепторами. Цей мутант був вибраний для більш докладного аналізу.

3D. Характеристика стабільності за допомогою кругового дихроїзму (CD)

50 Стабільність мутантного антитіла S298N/T299A/Y300S простежували за допомогою експерименту по термічному плавленню Far-UV CD, у якому простежували сигнал CD при 216 нм і 222 нм у вигляді збільшеної температури, що приводить до руйнування укладання антитіла (денатурації).

60 Температуру контролювали за допомогою термоелектричної установки Пельтьє (Jasco model AWC100) і збільшували зі швидкістю 1°C/хв. від 25 до 89°C. CD-спектри одержували на спектрофотометрі Jasco 815 при концентрації білка приблизно 0,5 мг/мл у буфері PBS у кварцовій кюветі (Hellma, Inc.) з довжиною пробігу 10 мм. Швидкість сканування складала 50 нм/хв. і крок даних 0,5 нм. Ширину смуги 2,5 нм використовували для настроювання чутливості

середовища. Сигнал CD і напругу НТ одержували при 210-260 нм з інтервалом даних 0,5 нм і при температурних інтервалах 1°C, і чотири повторних сканування були виконані для кожного зразка. Результати показують, що як дельта-AB Н66, так і мутант S298N/T299A/Y300S Н66 виявляють подібну термічну поведінку і мають приблизно однакову температуру початку деградації (приблизно 63°C) (фіг. 35), додатково припускаючи, що вони мають порівнянну стабільність.

Приклад 4. Функціональний аналіз Fc-сконструйованих мутантів

Fc-сконструйованих мутантів оцінювали в тесті проліферації PBMC і при аналізі вивільнення цитокінів. У тесті проліферації PBMC, PBMC людини культивували зі збільшуваними концентраціями терапевтичного антитіла протягом 72 годин, додавали ³H-тимідин, і клітини збирали через 18 годин. Для аналізу зменшення Т-клітин/вивільнення цитокінів PBMC людини культивували зі збільшуваними концентраціями терапевтичного антитіла і аналізували щодня на кількість і життєздатність клітин (Vi-cell, Beckman Coulter) до 7-го дня. Клітинні супернатанти також збирали, зберігали при -20°C і аналізували на 8-компонентній панелі цитокінів (Bio-Rad).

PBMC від нормального донора розморожували й обробляли при наступних умовах (усі в середовищі, що містить комплемент): необроблені; BMA031, molgG2b 10 мкг/мл; ОКТ3, molgG2a 10 мкг/мл; Н66, hulgG1 дельта-AB 10 мкг/мл, 1 мкг/мл і 0,1 мкг/мл; Н66, hulgG1 S298N/T299A/Y300S 10 мкг/мл, 1 мкг/мл і 0,1 мкг/мл.

Цитокіни одержували на 2-й день (D2) і 4-й день (D4) для аналізу Bioplex (IL-2, IL-4, IL-6, IL8, IL10, GM-CSF, IFN γ , TNF α). Клітини на D4 забарвлювали на експресію CD4, CD8, CD25 і $\alpha\beta$ TCR.

Результати, представлені на фіг. 5-8, показують, що Н66 S298N/T299A/Y300S поведився аналогічно Н66 дельта-AB у всіх виконаних клітинних аналізах, демонструючи мінімальну активацію Т-клітин шляхом експресії CD25, зв'язування з $\alpha\beta$ TCR (зі злегка відмінною від дельта-AB кінетикою) і мінімальне вивільнення цитокінів в обидва моменти часу D2 і D4. Мутант S298N/T299A/Y300S, таким чином, усуває ефекторну функцію так само ефективно, як і мутація дельта-AB.

Приклад 5. Одержання і характеристика сконструйованого варіанта Fc у каркасі антитіла проти CD52

На доповнення до антитіла Н66 проти $\alpha\beta$ TCR сконструйована також мутація S298N/Y300S у каркасі антитіла проти CD52 (клон 2C3). Цей мутант потім досліджували для визначення того, чи буде спостережувана модуляція ефекторної функції, виявлена в антитілі Н66 S298N/Y300S проти α TCR, сумісна з роботою в каркасі іншого антитіла.

5A. Створення антитіла 2C3 проти CD52 зі зміненими варіантами глікозилювання

Спочатку одержували варіант ДНК 2C3 S298N/Y300S за допомогою набору Quick Change mutagenesis з використанням pENTR_LIC_IgG1, і VH 2C3 WT клонували в мутантний вектор за допомогою LIC. Повнорозмірних мутантів клонували в експресійний вектор pCEP4(-E+I)Dest із застосуванням технології Gateway. Мутації потім підтверджували секвенуванням ДНК, і послідовності наведені в таблиці 11. Мутанти потім трансфікували в клітини HEK293-EBNA у форматі 6-ямкового планшета, і білок очищали з кондиційних середовищ. Антитіло 2C3 дикого типу проти CD52 одержували паралельно як контроль. Рівень експресії, як встановлено, складав 0,1 мкг/мл при використанні аналізу за допомогою SDS-PAGE і Вестерн-блотингу (фіг. 9A). Експресію мутантів у чистих кондиційних середовищах також вимірювали за допомогою захоплення білка протеїном А на Віасоге. Концентрацію визначали за допомогою реакції дисоціації з іммобілізованим білком А після шестихвилинної ін'єкції. Продуковане CHO антитіло 2C3 WT серійно розводили в середовищах від 90 мкг/мл до 1,5 нг/мл і використовували як стандартну криву. Концентрації розраховували аж до приблизно 0,2 мкг/мл за допомогою каліброваної кривої з використанням 4-параметричної підгонки. Відносні рівні експресії були низькими й загалом узгоджувалися з даними Вестерн-блотингу (фіг. 9).

Послідовності клону 2C3 антитіл проти CD52

SEG ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
28	Легкий ланцюг 2C3 WT проти CD-52	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVVYCVQGTHLHTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
29	Важкий ланцюг 2C3 WT проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWVGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	Важкий ланцюг 2C3 S298N/Y200S проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWVGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

5B. Аналіз глікозилювання за допомогою PNG-ази F

Для оцінки додаткових сайтів глікозилювання, введених за допомогою мутації, збагачений S298N/Y300S мутант деглікозилювали за допомогою PNG-ази F. Це не продемонструвало якої-небудь явної зміни молекулярної маси, що вказує на те, що ніяких додаткових вуглеводів не було присутньо (фіг. 10). Проводили одержання в невеликому масштабі для того, щоб очистити ці мутанти для подальшої характеристики, і результати повторно підтвердили, що в мутанті S298N/Y300S не присутні додаткові вуглеводи (фіг. 11).

5C. Зв'язувальні властивості мутантів антитіла 2C3 проти CD52 з Fc γ RIIIa людини з використанням Віасоге

Віасоге також використовували для характеристики зв'язування антигену, Fc γ RIII і зв'язувальних властивостей очищених антитіл (фіг. 12, 13 і 14). Варіант 2C3 S298N/Y300S міцно зв'язаний з пептидом CD52, і зв'язувальна сенсограма не відрізнялася від контролю дикого типу, демонструючи, що ця мутація не впливає на його зв'язування з антигеном (фіг. 12A).

Для аналізу ефекторної функції Fc у дослідженнях зв'язування використовували рецептор Fc γ RIII (Val158). Мутантне і контрольне антитіло дикого типу розбавляли до 200 нМ і вводили в HPC4-тег із захопленим Fc γ RIIIa. Зв'язування Fc γ RIII було майже неможливо знайти у випадку мутанта S298N/Y300S, що вказує на втрату ефекторної функції цим варіантом (фіг. 12B і фіг. 14A). Для подальшого аналізу ефекторної функції Fc рецептор Fc γ RIII (Phe158) також використовували в дослідженнях зв'язування. Мутантне антитіло і контрольне антитіло дикого типу розбавляли до 200 нМ і вводили в HPC4-тег із захопленим Fc γ RIIIa. Зв'язування Fc γ RIII було майже неможливо знайти у випадку мутанта S298N/Y300S, що вказує на втрату ефекторної функції варіанта Phe158 (фіг. 14B). Нарешті, Віасоге використовували для

порівняння зв'язуючих FcRn властивостей очищених білків. FcRn-HPC4 миші й очищений SEC FcRn-HPC4 людини іммобілізували на чипі CM5 через з'єднання з аміном. Кожне антитіло розводили до 200, 50 і 10 нМ і вводили поверх рецепторів. Campath, продуковані CHO 2C3 WT, і DEPC-оброблені Campath включали як позитивні і негативні контролю. Ці дані показують, що мутант зв'язує рецептор FcRn як людини, так і миші з тією ж спорідненістю, що і контрольні антитіла дикого типу, і що він, швидше за все, не має яких-небудь змін у його періоді напівжиття в кровотоку або в інших фармакокінетичних властивостях (див. фіг. 12С, фіг. 13А і В). Відповідно, мутація S298N/Y300S застосовна до антитіл загалом для зниження або усунення небажаної ефекторної функції Fc, наприклад, за допомогою взаємодії з рецепторами Fcγ людини.

Приклад 6. Визначення циркулюючих імунних комплексів мутанта S298N/Y300S

Проводили також визначення циркулюючих імунних комплексів за допомогою аналізу зв'язування C1q мутантом S298N/Y300S і контрольним WT. Сильно зв'язуючі 96-ямкові планшети Costar покривали протягом ночі при 4°C 100 мкл 2-кратних серійних розведень Ab 2C3 у концентраціях у діапазоні від 10 до 0,001 мкг/мл у буфері для покриття (0,1M NaCHO₃, pH 9,2). Аналіз ELISA показав, що зв'язування C1q мутантом S298N/Y300S зменшується в порівнянні з WT (фіг. 15А). Зв'язування Ab проти Fab до покритих Ab 2C3 підтвердили еквівалентне покриття ямок (фіг. 15В).

Приклад 7. Розділення і аналіз мутанта S298N/Y300S з використанням методів ізоелектрофокусування

Ізоелектричне фокусування (IEF), pH 3-10, проводили з метою характеристики мутантів S298N/Y300S. S298N/Y300S, як встановлено, мав більше негативних зарядів і, отже, імовірно, більше молекул сілової кислоти (фіг. 18А). Як мутант S298N/Y300S, так і WT 2C3, як показано за допомогою інтактною МС, мали G0F і G1F як домінуючі види глікозилювання (фіг. 18В і D, відповідно).

Приклад 8. Антигензв'язувальна спорідненість S298N/Y300S

Biacore використовували для порівняння антигензв'язувальної спорідненості Ab 2C3 WT проти CD52 і мутанта S298N/Y300S, що був одержаний і очищений як у невеликих (фіг. 16), так і у великих масштабах (фіг. 17) експресії. Одержували чипи CM5 з іммобілізованим пептидом 741 CD52 і контрольним пептидом 777. Антитіла серійно розводили в 2 рази від 60 до 0,2 нМ у HBS-EP і потім вводили поверх поверхні чипа протягом 3 хв. із наступною дисоціацією протягом 5 хв. у буфері при швидкості потоку 50 мкл/хв. Поверхню потім регенерували 1 пульсом 40 мМ HCl. Ці дослідження виконували в двох паралелях, і вони продемонстрували, що мутант S298N/Y300S і антитіла 2C3 WT демонструють порівнянне зв'язування пептиду CD52.

Для перевірки функціональних зв'язувальних властивостей перед очищенням, спрямованим на скринінг антитіл, створених при трансфекціях у невеликому масштабі, розробили платформу скринінгу середовищ. Ці тести проводили з використанням Octet (фіг. 19А) для визначення концентрації і з використанням біосенсорів на основі протеїну А і стандартної кривої GLD52. Зразки розводили до 7,5 і 2 нМ у HBS-EP для порівняння зв'язування CD52 з використанням Biacore (фіг. 19В). Результати тестування зв'язування пептиду показали, що як мутант S298N/Y300S, так і антитіло 2C3 WT характеризуються порівняним зв'язуванням пептиду CD52. Крім того, ці аналізи показують, що Octet і Biacore добре працюють відносно прогнозування зв'язування антигену з антитілами при трансфекціях у невеликому масштабі.

Приклад 9. Одержання мутантів S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S і N297Q/S298N/Y300S зі зміненим глікозилюванням у каркасах додаткових антитіл

На доповнення до антитіла проти αβTCR і антитіла 2C3 проти CD-52 були сконструйовані мутації S298/Y300S, S298N/T299A/Y300S і N297Q/S298N/Y300S у каркасах інших антитіл для підтвердження того, що додатковий тандемний сайт глікозилювання може бути введений у неспоріднені послідовності варіабельних доменів важких ланцюгів. Мутанти 12G6 проти CD-52 і мутанти проти Her2 з альтернативним глікозилюванням представлені в таблицях 12 і 13.

Послідовності клону 12G6 антитілу проти CD52

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
31	Легкий ланцюг 12G6 WT проти CD-52	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWV LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCVQGSFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQSDKSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
32	Важкий ланцюг 12G6 WT проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
33	Важкий ланцюг 12G6 S298N/Y300S проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNNLSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
34	Важкий ланцюг 12G6 S298N/T299A/Y300S проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
35	Важкий ланцюг 12G6 N297Q/S298N/Y300S проти CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNLSRVS VLVTLVHLDWLNGLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*

Таблиця 13

Послідовності антитіла проти HER2

SEQ ID NO	Назва	Амінокислотна послідовність
36	Легкий ланцюг WT проти Her2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPK GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTITSSLPEDF ATYYCQGHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
37	Важкий ланцюг WT проти Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
38	Важкий ланцюг антитіла S298N/T299A/Y300S проти Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNLSRVS VLVTLVHLDWLNGLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

5 Приклад 10. Створення змінених антитіл, що містять реакційноздатні частини гліканів
Для створення антитіл, що містять частини гліканів, здатні вступати в реакцію з дериватизованими ефекторними фрагментами, антитіло проти HER спочатку глікозилували *in vitro* з використанням глікозилтрансферази і відповідних донорів УДФ-цукрів. Наприклад, для введення залишків сілової кислоти донорські антитіла спочатку галактозилували за допомогою

β-галактозилтрансферази, потім сіалілували за допомогою α2,6-сіалілтрансферази відповідно до методів Kaneko et al. (Kaneko Y., Nimmerjahn F. and Ravetch J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 313, 670-3). Реакцію здійснювали при стадії синтезу в одній реакційній посудині з використанням β-галактозилтрансферази (50 мО/мг, Sigma) і α2,6-сіалілтрансферази (5 мкг/мг, R&D system) із субстратами-донорами цукрів нуклеотидів, УДФ-галактозою (10 мМ) і CMP-сіаловою кислотою (10 мМ) у 50 мМ MES буфері (рН 6,5), що містить 5 мМ MnCl₂. Реакційну суміш, що містить 5 мг/мл антитіла проти HER2, інкубували протягом 48 годин при 37°C. Сіалілування підтверджували за допомогою аналізу MALDI-TOF MS попередньо метильованих гліканів, що вивільняються з антитіла під дією PNG-ази F, аналізу вмісту сіалової кислоти з використанням ВЕРХ Dionex і блотингу лектину з SNA, лектину, специфічного для α2,6-сіалової кислоти.

MALDI-TOF-аналіз гліканів, що вивільняються за допомогою обробки PNG-азою сіалілованого антитіла проти HER2, показав, що нативні глікани повністю ремодельовані головним чином у моносіаліловану 2-антенарну структуру, A1F (фіг. 27A), разом з невеликою кількістю дисіалілованих видів. Обробка антитіла більш високими кількостями α2,6-сіалілтрансферази дала більш гомогенні популяції глікоформи A1F, що передбачає, що або активність ферменту, або локалізація гліканів може перешкоджати повному сіалілуванню. Вміст сіалової кислоти визначений як такий, що складає ~2 моль на моль антитіла, що збігається з гліканом A1F як основним видом глікоформи (фіг. 27B). Блотинг лектину з лектином SAN, Sambucus nigra agglutinin, специфічного для α2,6-зв'язаної сіалової кислоти, підтвердив, що сіалова кислота була присутня в конфігурації α2,6-зв'язку (фіг. 27C).

Отже, що хоча глікани нативного білка до деякої міри гетерогенні, ремоделювання за допомогою галактозил- і сіалілтрансфераз дає приблизно гомогенне антитіло з моносіалілованими, але повністю галактозилованими 2-антенарними гліканами (A1F). Введення тільки ~1 сіалової кислоти на два акцептори галактози в кожному розгалуженому глікані може бути обумовлене обмеженою доступністю однієї з галактоз гліканів, що часто схована в антитілі, або нековалентними взаємодіями гліканів з поверхнею білка.

Приклад 11. Окислювання змінених антитіл, що містять реакційноздатні частини гліканів

Після підтвердження сіалілування досліджували процес окислювання сіалілованого антитіла проти HER2 різними концентраціями перйодату (від 0,25 до 2 мМ). Спочатку проводили обмін буфера сіалілованого антитіла на 25 мМ Тріс-НСІ (рН 7,5), що містить 5 мМ ЕДТО, з наступною заміною буфера на буфер PBS. Суміш забуферених антитіл потім наносили на колонку протеїн А-сефарози, попередньо зрівноважену буфером PBS. Потім колонку промивали PBS в об'ємі 15 колонок, PBS в об'ємі 15 колонок, що містить 5 мМ ЕДТО, і PBS в об'ємі 30 колонок, потім їх елюювали 25 мМ цитрат-фосфатним буфером (рН 2,9). Елюати негайно нейтралізували двоосновним фосфатним буфером, і антитіла концентрували з використанням Amicon ultra від Millipore. Після очищення сіаліловане антитіло проти HER2 потім окисляли перйодатом натрію (Sigma) у 100 мМ натрій-ацетатного буфера (рН 5,6) на льоду в темряві протягом 30 хвилин, і реакцію гасили 3% гліцерином на льоду протягом 15 хвилин. Продукт знесолювали і проводили заміну буфера на 100 мМ натрій-ацетатний буфер (рН 5,6) шляхом 5 циклів ультрацентрифугування через Amicon 50 кДа. На фіг. 28А показаний аналіз вмісту сіалової кислоти сіалілованого антитіла, протитрованого різними кількостями перйодату. Повне окислювання залишків сіалової кислоти досягалося при концентрації перйодату 0,5 мМ. Дійсно, настільки низька концентрація перйодату як 0,5 мМ достатня для повного окислювання введеної сіалової кислоти. Відповідно, концентрація 1 мМ перйодату була вибрана для окислювання сіалілованого антитіла для кон'югації з ліками.

Окислювання може надавати несприятливі ефекти на цілісність антитіла. Наприклад, окислювання залишків метіоніну, включаючи Met-252 і Met-428, локалізованих в області CH3 Fc у безпосередній близькості до сайту зв'язування FcRn, як відомо, впливає на зв'язування FcRn, що є вирішальним для продовження періоду напівжиття антитіла в сироватці (Wang W. et al. (2011), Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol. Immunol. 48, 860-6). Відповідно, була проведена перевірка потенційних побічних ефектів окислювання перйодатом на залишках метіоніну (наприклад, Met-252), вирішальних для взаємодії з FcRn сіалілованого антитіла в окисленому стані, при визначенні за допомогою аналізу РХ/МС пептидів після гідролізу трипсином. Цей аналіз виявив ~30% окислювання Met-252 і <10% окислювання Met-428 після обробки сіалілованого трастузумабу 1 мМ перйодатом. Для визначення внеску цієї міри окислювання метіоніну в зв'язування FcRn оцінювали кінетику зв'язування FcRn кожним антитілом з використанням поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore). Цей аналіз виявив, що окислений стан корелював з мінорною втратою зв'язування FcRn (зниження Ка на 12% і 26% для FcRn миші і людини, див. фіг. 28В і 28С, відповідно). Слід

зазначити, що ~25% зниження Ка для FcRn людини, як повідомлялося, не впливає на період напівжиття в сироватці у трансгенної миші з FcRn людини, оскільки один інтактний сайт FcRn на кожному антитілі достатній для забезпечення функціонування і переваги РК (Wang et al., там же).

5 Таким чином, ці дані показують, що введення чутливих до періодату залишків сіалової кислоти за допомогою обробки сіалілтрансферазою дозволяє використовувати набагато більш низькі концентрації періодату, що приводить до мінімальних побічних ефектів при взаємодіях антитіло-FcRn і цілісності антитіла при оцінці по агрегації ($\leq 1\%$). Таким чином, застосування сіалілованих антитіл згідно зі способами за винаходом надає більш широке вікно для застосовуваних умов окислювання, дозволяючи створювати відтворювану генерацію активних глікокон'югатів, не впливаючи на період їх напівжиття в сироватці.

10 Галактоза в гіперглікозилованому мутантному антитілі також може бути окислена конкретно при використанні галактооксидази для створення альдегідної групи для кон'югації. Для підтвердження цього підходу антитіло A114N проти TEM1 концентрували до 13-20 мг/мл і потім обробляли 20 МО/мг сіалідазою у PBS протягом 6 годин при 37°C. Десіалілований продукт потім окисляли галактооксидазою (GAO), спочатку 5 мкг GAO/мг білка протягом ночі при 37°C з наступним додаванням 2 мкг GAO/мг білка й інкубацією протягом додаткових 5 годин. Ацетат натрію додавали для доведення рН до 5,6 (0,1 об./об., рН 5,6) і DMSO додавали для досягнення кінцевої концентрації реакційної суміші 16% перед кон'югацією. Гіперглікозиловане мутантне антитіло A114N проти HER (15 мг/мл) десіалілували подібним чином за допомогою сіалідази (20 МО/мг) і окисляли за допомогою 5 мкг GAO/мг білка в одиночній реакції протягом ночі при 37°C.

Приклад 12. Синтез реакційноздатних ефекторних частин

15 Для того, щоб полегшити кон'югацію з дериватизованими альдегідом глікоформами антитілу за винаходом, кандидатні ефекторні частини ліків (наприклад, монометилауристатину Е (ММАЕ) і доластатину 10 (Dol10) дериватизували амінооксицистамідом для включення функціональних груп (наприклад, аміноокси-цис), що специфічно реагують з альдегідом.

20 Коротко, для одержання амінооксицистаміду як вихідної речовини S-триетил-L-цистеїнамід (362 мг, 1 ммоль) додавали до 3 мл DMF-розчину N-гідроксисукцинімідного складного ефіру трет-ВОО-амінооксіоцтової кислоти (289 мг, 1 ммоль). Реакція завершувалася через 3 години, про що свідчив аналіз ВЕРХ. Реакційну суміш потім розводили 30 мл дихлорметану і промивали 0,1М бікарбонатом натрію (2×20 мл), водою (2×20 мл) і сольовим розчином (2×20 мл). Розчин сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха. До цього сухого залишку додавали 3 мл TFA і потім 150 мкл триетилсилану. Одержаний розчин осаджували з трет-бутилметилового ефіру, і процес повторювали три рази. Після фільтрації залишок сушили при зниженому тиску з одержанням 250 мг не зовсім білої твердої речовини (вихід 67%). Сполуку використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

35 Для одержання амінооксидериватизованого ММАЕ (аміноокси-цис-МС-VC-РАВС-ММАЕ) 30,1 мг амінооксицистаміду (0,098 ммоль, 2 екв.) об'єднували з 64,6 мг МС-VC-РАВС-ММАЕ (0,049 ммоль) і 100 мкл триетиламіну в 3 мл DMF. Одержану реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, за цей час реакція завершувалася, судячи з аналізу ВЕРХ. Сполуку очищали препаративною ВЕРХ із виходом 45 мг (62%) бажаного продукту у вигляді не зовсім білої твердої речовини. Аналіз ВЕРХ з оберненою фазою передбачав чистоту сполуки >96%. ESI розраховано для C73H116N14O18S (MH)⁺ 1509,8501; знайдено m/z 1509,8469.

45 Для одержання амінооксидериватизованого Dol10 (аміноокси-цис-МС-VC-РАВС-PEG8-Dol10) 7,4 мг (0,024 ммоль, 3 екв.) амінооксицистаміду, 12 мг (0,008 ммоль) МС-VC-РАВС-PEG8-Dol10 і 30 мкл триетиламіну об'єднували в 3 мл DMF. Реакція завершувалася через 15 хвилин, судячи з аналізу ВЕРХ. При очищенні препаративною ВЕРХ одержано 6,2 мг (46%) бажаного продукту у вигляді не зовсім білої твердої речовини. Аналіз ВЕРХ з оберненою фазою передбачав чистоту сполуки >96%. ESI розраховано для C80H124N16O19S2 (MH)⁺ 1678,0664; знайдено m/z 1678,0613.

Приклад 13. Кон'югація реакційноздатних ефекторних частин, опосередковувана сіаловою кислотою (SAM)

55 Після знесолення ліки-лінкери з прикладу 11 об'єднували з окисленими сіалілованими антитілами з прикладу 10 у 75% DMSO у концентрації 25 мМ до досягнення молярного відношення ліків-лінкера до антитіла 24:1 і кінцевої концентрації антитіла 5 мг/мл. Суміш інкубували протягом ночі при кімнатній температурі. Не включені ліки-лінкери і вільні ліки видаляли з використанням BioBeads. Проводили заміну буфера продукту на гістидин-Твін-буфер з використанням колонок PD-10 і стерильної фільтрації. Визначали рівні ендотоксинів, і вони досягали менше 0,1 EU/мг при дослідженні in vivo.

На фіг. 29A-C показані хроматограми гідрофобної взаємодії (HIC) різних сіалілованих антитіл (B11 і G11 проти FAP і антитіла проти HER2 із прикладу 11), глікокон'югованих з АО-ММАЕ. Сіаліловане антитіло проти HER2 також кон'югували з ліками-лінкером, АО-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (фіг. 29D). Цей аналіз виявляє наявність головним чином одного або двох кон'югатів ліків на антитіло з відношенням ліків до антитіла (DAR) у діапазоні від 1,3 до 1,9. Підвищення часу затримки глікокон'югата Dol10 (фіг. 29D) у порівнянні з глікокон'югатом ММАЕ (фіг. 29C) ймовірно обумовлене більш високою гідрофобністю Dol10.

Проводили також аналіз РХ-МС з антитілом проти HER, кон'югованим із двома різними ліками-лінкерами (АО-ММАЕ або АО-PEG8-Dol10) у масштабі 30 мг. Цей аналіз показав подібні величини DAR 1,7 і 1,5 після кон'югації, що порівнянно з аналізом HIC. Виключна за розміром хроматографія (SEC) показала дуже низькі рівні (1%) агрегатів у цих кон'югатів.

Приклад 14. Кон'югація реакційноздатних ефекторних частин, опосередковувана галактозою (GAM)

Альдегід галактози, утворений за допомогою галактооксидази на A114N гіперглікозилованого мутантного антитіла проти TEM1, як описано в прикладі 11, кон'югували з 24 молярним надлишком аміноокси-MC-VC-PABC-MMAE ліків-лінкера через антитіло шляхом нічної інкубації при 25°C з одержанням кон'югата ADC з величиною DAR 1,72.

До антитіла проти HER, обробленого галактооксидазою, одержаного, як описано в прикладі 11, додавали одну десяту реакційного об'єму 1M ацетату натрію, рН 5,6, з доведенням рН до 5,6 і додавали DMSO зі створенням кінцевої концентрації 14% перед додаванням 24 екв. аміноокси-MC-VC-PABC-MMAE ліків-лінкера. Реакційні суміші інкубували протягом ночі при кімнатній температурі. Вільні ліки і ліки-лінкер очищали за допомогою Biobeads, і у продукту проводили зміну буфера на SEC (вихід 65%). Як показано на фіг. 30, АО-ММАЕ кон'югувався з ~60% молекул.

Приклад 15. Тестування впливу ADC на клітинну проліферацію *in vitro*

Активність молекул глікокон'югатів проти HER і проти FAP за винаходом *in vitro* порівнювали також з відповідними тіоловими кон'югатами, що містять ту ж саму лікарську частину, зв'язану через тіолові зв'язки з цистеїнами області шарніра того ж донорського антитіла. Тіолові кон'югати містили приблизно в два рази більшу кількість ліків на антитіло (DAR), ніж глікокон'югати. Кон'югацію на основі тіолів здійснювали, як описано Stefano et al. (Methods in Molecular Biology 2013, у друці). Потім використовували клітинні лінії Her2+ SK-BR-3 і Her2-MDA-MB-231 для оцінки відносної ефективності кожного ADC. Результати цього аналізу представлені в таблиці 15 нижче.

Таблиця 15

Порівняння EC₅₀ глікокон'югатів і тіолових кон'югатів

	DAR	EC ₅₀ (нг/мл)
MC-VC-PABC-MMAE проти HER (тіол-MMAE)	3,8*	2,3
АО-Cys-MC-VC-PABC-MMAE проти HER (гліко-MMAE)	1,7*	4,7
MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 проти HER (тіол-Dol10)	3,9*	0,45
АО-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 проти HER (гліко-Dol10)	1,5*	0,97
B11-MC-VC-PABC-MMAE проти FAP (тіол-MMAE), CHO+FAP	3,3**	382,4
B11-АО-Cys-MC-VC-PABC-MMAE проти FAP (гліко-MMAE), CHO+FAP	1,5**	682,4

Примітка: *DAR визначали за допомогою РХ-МС; **DAR визначали за допомогою HIC.

На фіг. 31 показане порівняння ефективності *in vitro* глікокон'югата проти HER і його аналога тіолового кон'югата. Життєздатність клітин визначали після експозиції кон'югатів протягом 72 годин із клітинами (SK-BR-3), експресуючими антиген Her2 (фіг. 31A і C) або не експресуючими його клітинами (MDA-MB-231) (фіг. 31B і D). ADC, що містять або ММАЕ, або PEG8-Dol10, з'єднували з гліканами ("гліко") або з цистеїнами області шарніра за допомогою традиційних хімічних методів ("тіоли"). Як показано на фіг. 30A і C, у ~2 рази більш низька EC₅₀ виявлена для тіолових кон'югатів у порівнянні з глікокон'югатами, що відповідає в два рази більш високому DAR у перших у порівнянні з останніми. Ніякої токсичності будь-якого антитіла при концентрації до 100 мкг/мл не було виявлено для клітинної лінії Her2-.

Подібні тенденції спостерігалися також відносно клітинної проліферації для ADC, одержаних з антитілами проти пухлинного антигену (FAP), що інтенсивно експресується реактивними фібробластами строми при епітеліальних типах раку, включаючи рак ободової кишки, підшлункової залози і молочної залози (Teicher B. A. (2009), Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9, 982-1004). Ці кон'югати знову одержували шляхом кон'югації або аміноокси-MMAE ліків-лінкера, або малеїмідо-MMAE ліків-лінкера з гліканами або тіоловою групою. Тести по впливу цих кон'югатів на клітинну проліферацію показали, що EC₅₀ тіолового кон'югата характеризувалася на клітинах CHO, трансфікованих FAP людини, у ~100 разів більш високою ефективністю, ніж на тих же клітинах, не експресуючих FAP, як зображено на фіг. 32, на якій показане порівняння ефективності *in vitro* глікокон'югата B11 проти FAP і тіолового кон'югата. Визначали виживаність клітин після експозиції кон'югатів із клітинами CHO, трансфікованими або не трансфікованими антигеном FAP. ADC містили MMAE, з'єднаний із гліканами ("гліко") або з цистеїнами області шарніра за допомогою традиційних хімічних методів ("тіол"). Слід зазначити, що в ~2 рази більш низька EC₅₀ для тіолу в порівнянні з глікокон'югатами відповідає відносним кількостям ліків, що доставляються, на антитіло, передбачаючи подібну ефективність зв'язування мішені і інтерналізації в експресуючі антиген клітини CHO. Паралельно оцінювали глікокон'югат ADC проти FAP (B11) з DAR 1,5, як описано вище, і виявили у ~2 рази більш високу EC₅₀ у порівнянні з тіоловим кон'югатом (DAR 3,3).

Як показано на фіг. 36, подібні тенденції спостерігалися відносно аналізу клітинної проліферації для ADC, одержаного з антитілом проти HER, що несе гіперглікозилуючу мутацію A114N, і АО-MMAE, як описано в прикладі 14, при аналізі на клітинах, експресуючих SK-BR-3, або клітинах MDA-MB-231. Глікокон'югат A114N чітко продемонстрував збільшену клітинну токсичність відносно клітинної лінії, експресуючої Her2, відносно не експресуючої його лінії. Відносна токсичність у порівнянні з глікокон'югатом SialT, одержаним з тим же антитілом, відповідає більш низькому навантаженню ліками в цьому препараті.

Аналіз впливу на клітинну проліферацію був також здійснений для ADC, одержаного з антитілом проти TEM1, що несе гіперглікозилуючу мутацію A114N, і АО-MMAE, одержаним, як описано в прикладі 14. Більш висока токсичність спостерігалася в клітинних лініях SJSA-1 і A673, експресуючих TEM1, у порівнянні з лінією MDA-MB-231, не експресуючою його. Рівень токсичності в порівнянні з традиційним тіоловим кон'югатом з тим же антитілом відповідав навантаженню ліками (DAR) у цьому препараті.

	SJSA-1	A673-RPMI	A673-DMEM-RPMI	MDA-MB-231
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
A114N-АО-МС-VC-РАВС-MMAE проти TEM1	3 мкг/мл	3,2 мкг/мл	2,2 мкг/мл	40 мкг/мл
МС-VC-РАВС-MMAE проти TEM1	4 мкг/мл	1 мкг/мл	0,9 мкг/мл	20 мкг/мл

Отже, сайт-специфічна кон'югація ліків через глікани з розщеплюваними лінкерами дає ADC з токсичністю й ефективністю *in vitro*, що еквівалентні традиційним кон'югатам на основі тіолів, як показано за допомогою різних антитіл і різних ліків-лінкерів. Більше того, при концентрації періодату нижче 2 мМ рівень кон'югації ліків корелює з відновленням сілової кислоти. Підвищення концентрації періодату вище 2 мМ дає невелику перевагу через очікування повного перетворення сілової кислоти в окиснену форму. Однак при всіх умовах кількість молекул ліків на антитіло злегка нижче, ніж кількість сілової кислоти, указуючи на те, що деяка кількість окислених сілових кислот може бути також недоступна для приєднання, або через їх прихованість, або через обумовлену іншим чином стеричну перешкоду, що виникає через величину ліків-лінкера.

Приклад 16. Характеристика кон'югатів антитіло-ліки *in vivo*

Ефективність глікокон'югатів проти HER оцінювали також у моделі ксенотрансплантатів пухлинних клітин Her2+ і порівнювали з тіоловими кон'югатами як речовинами порівняння, що мають у ~2 рази більш високе DAR. Мишам Beige/SCID імплантували пухлинні клітини SK-OV-3 Her2+, яким дозволяли досягати розмірів пухлини ~150 мм³ перед початком лікування. ADC у дозах 3 або 10 мг/кг вводили в хвостову вену на 38, 45, 52 і 59 день. Використовували ~10 мишей на групу. Вимірювали об'єм пухлин у мишей різних груп і записували їх виживаність. Криві виживаності будували по методу Каплана-Мейєра.

На фіг. 33 показане порівняння ефективності *in vivo* глікокон'югатів проти HER і тіолових кон'югатів у моделі ксенотрансплантатів пухлинних клітин Her2+. Мишам Beige/SCID з імплантованими пухлинними клітинами SK-OV-3 Her2+ вводили дози MMAE (фіг. 33A і B) і

PEG8-Dol10 (фіг. 33C і D), що містять глікокон'югати або тіолові кон'югати як речовини порівняння, що мають у ~2 рази більш високе DAR. Кінетика росту пухлин кон'югатів з ММАЕ показана на фіг. 33А. У цьому випадку глікокон'югат показав суттєво більш високу ефективність у порівнянні з одним чистим антитілом (чорні), але меншу ніж тіоловий кон'югат як речовина порівняння, що має в ~2 рази більш високе DAR (зелений). Глікокон'югат з ММАЕ показав суттєву регресію пухлин і ~20-денну затримку росту пухлин (фіг. 33А), і ~2-кратне підвищення часу виживаності від першої дози (фіг. 33В). Тіоловий кон'югат з ММАЕ показав майже повне пригнічення пухлини в тій же дозі АСД (10 мг/кг).

Визначали також ефективність *in vivo* глікокон'югата PEG8-Dol10 ("гліко Dol10") і тіолового кон'югата як речовини порівняння з у ~2 рази більш високим DAR ("тіол Dol10") у тій же самій моделі ксенотрансплантатів пухлинних клітин Her2+. Обидва кон'югати продемонстрували більш низьку ефективність, ніж кон'югати з ММАЕ, як описано вище. Однак глікокон'югат аміноокси-PEG8-Dol10 ("гліко Dol10") у дозі 10 мг/кг продемонстрував 15-денну затримку росту пухлин (фіг. 33С) і ~20-денне підвищення часу виживаності після першого введення (фіг. 33D). Тіоловий кон'югат був більш ефективним у тій же дозі, демонструючи 2-кратне підвищення виживаності. У більш низькій дозі (3 мг/кг) тіоловий кон'югат продемонстрував меншу ефективність, ніж глікокон'югат у дозі 10 мг/кг. Ця доза відповідає дозі 80 мкмоль ліків PEG8-Dol10 на кг у порівнянні з дозою 110 мкмоль ліків PEG8-Dol10 на кг для глікокон'югата.

Ці дані показують, що сайт-специфічна кон'югація ліків з сіаловою кислотою гліканів антитіла дає молекули з ефективністю, порівнянню з АСД, одержуваних хімічно на основі тіолів. Трохи більш низька ефективність *in vivo* очевидно відбувається через меншу кількість ліків, що несе кожне антитіло в пухлинні клітини в результаті інтерналізації кожного антигену, зв'язаного з антитілом. Хоча автори не порівнювали ці глікокон'югати з тіоловими кон'югатами з тим же DAR, спостережувана ефективність при різних дозах двох АСД, що надають порівнянні рівні ліків, що вводяться, показує, що глікокон'югати мають властиву їм ефективність, порівнянню з їх тіоловими аналогами, показуючи відсутність шкідливого впливу кон'югації в цьому сайті. Більше того, доза 10 мг/кг глікокон'югата Dol10, при якій вводиться тільки на 28% більше ліків, давала 2-кратне підвищення виживаності в порівнянні з тіоловим кон'югатом (у дозі 3 мг/кг), передбачаючи, що ці кон'югати можуть навіть забезпечити кращу ефективність при тому ж DAR. При представленому уявному обмеженні у включенні сіалової кислоти в нативні глікани більш високе навантаження ліками може бути досягнуте за допомогою різних стратегій, включаючи використання розгалужених лінкерів ліків або введення додаткових сайтів глікозилування і використання такого ж способу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає домен Fc, де домен Fc включає залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU, і де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент має більш низьку афінність до рецептора Fc γ , ніж антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що має нативний домен Fc.

2. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, для якого виконується одна або декілька наступних умов:

а) антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент додатково включає залишок аланіну в положенні амінокислоти 299 відповідно до нумерації EU;

б) антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент додатково включає залишок глутаміну в положенні амінокислоти 297 відповідно до нумерації EU;

с) домен Fc являє собою домен Fc IgG1;

д) бічний ланцюг залишку аспарагіну зв'язаний з гліканом через β -глікозиламідний зв'язок; і

е) рецептор Fc γ являє собою Fc γ RI і/або Fc γ RIIIa.

3. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 2, для якого виконується одна або декілька наступних умов:

а) домен Fc походить від людини;

б) глікан являє собою 2-антенарний глікан;

с) глікан являє собою природну глікоформу ссавців;

д) глікан включає реакційноздатну альдегідну групу;

е) глікан включає окислений залишок сахариду, що включає реакційноздатну альдегідну групу; і

ф) глікан зв'язаний з ефекторною частиною.

4. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 3, для якого виконується одна або декілька наступних умов:

- а) окислений залишок сахариду являє собою кінцеву сіалову кислоту або галактозу;
- б) ефекторна частина являє собою цитотоксин, який необов'язково вибраний з групи цитотоксинів, перерахованих в Таблиці 1;
- 5 с) ефекторна частина являє собою детектуючий агент;
- д) ефекторна частина включає рН-чутливий лінкер, дисульфідний лінкер, чутливий до ферменту лінкер або іншу розщеплювану лінкерну частину; і
- е) ефекторна частина включає лінкерну частину, вибрану з групи лінкерних частин, представлених в Таблицях 2 або 14.
- 10 5. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 3-4, у якого ефекторна частина зв'язана через оксимний або гідрозонний зв'язок із залишком сахариду глікану, і/або залишок сахариду являє собою кінцеву сіалову кислоту або залишок галактози глікану.
6. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з попередніх пунктів, який являє собою антитіло або імуноадгезин.
- 15 7. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає домен Fc, де домен Fc включає:
- а) вільний залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; і вільний залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU; або
- 20 б) модифікований залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; і вільний залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU.
8. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 7, для якого виконується одна або декілька наступних умов:
- 25 а) ефекторна частина зв'язана через бічний ланцюг модифікованого залишку аспарагіну із залишком сахариду глікану антитіла або його антигензв'язувального фрагмента; і
- б) ефекторна частина зв'язана через оксимний або гідрозонний зв'язок із залишком сахариду глікану.
9. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 8, для якого виконується одна або декілька наступних умов:
- 30 а) сахарид являє собою кінцеву сіалову кислоту або залишок галактози глікану;
- б) модифікований залишок аспарагіну зв'язаний з ефекторною частиною ліків з утворенням кон'югата антитіло-ліки (ADC).
10. Композиція, що включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з попередніх пунктів, і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт.
- 35 11. Застосування ефективної кількості композиції за п. 10 як лікарського засобу.
12. Виділений полінуклеотид, що кодує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-9.
13. Вектор, який включає полінуклеотид за п. 12.
14. Клітина-хазяїн, яка включає полінуклеотид або вектор за п. 12 або 13.
- 40 15. Спосіб отримання антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що включає експресію полінуклеотиду за п. 12 або вектора за п. 13 в клітині.
16. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, що являє собою імуноадгезин, який містить зв'язувальну область не від антитіла.
- 45 17. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 16, де зв'язувальна область не від антитіла являє собою рецептор.
18. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 16, де зв'язувальна область не від антитіла являє собою ліганд рецептора.
19. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить щонайменше одну зв'язувальну область, яка являє
- 50 собою лігандзв'язувальний сайт рецептора.
20. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить щонайменше одну зв'язувальну область, яка являє собою зв'язуючий рецептор сайт ліганду.
21. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 7, який являє собою антитіло.
- 55 22. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 7, яке являє собою імуноадгезин, що містить зв'язувальну область не від антитіла.
23. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 22, де зв'язувальна область не від антитіла являє собою рецептор.
24. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 22, де зв'язувальна область не від
- 60 антитіла являє собою ліганд рецептора.

25. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 7, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить щонайменше одну зв'язувальну область, яка являє собою лігандзв'язувальний сайт рецептора.

26. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 7, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить щонайменше одну зв'язувальну область, яка являє собою зв'язуючий рецептор сайт ліганду.

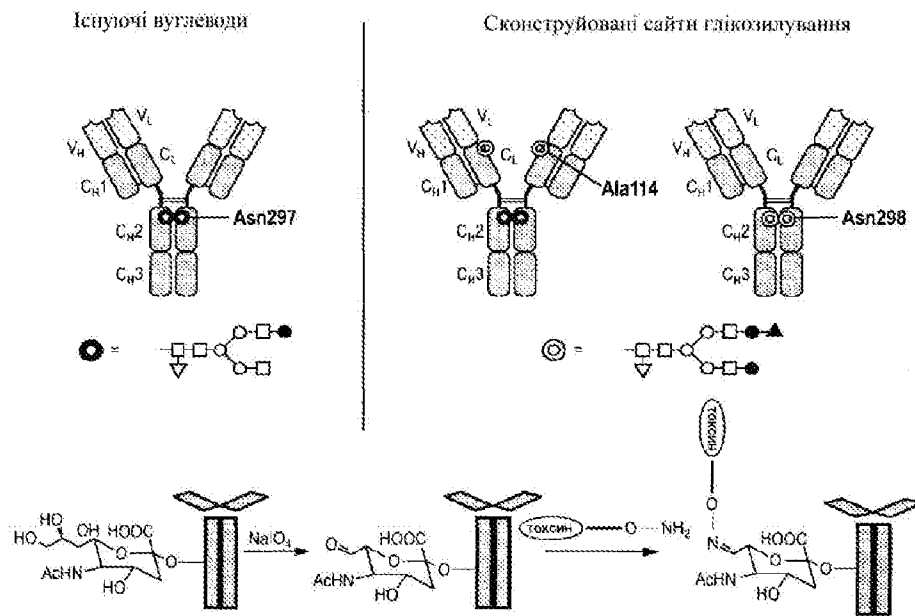
27. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає домен Fc IgG1 людини, де домен Fc містить: залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 297 відповідно до нумерації EU; залишок глікозилизованого аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; амінокислоту в положенні 299 відповідно до нумерації EU; де вказана амінокислота в положенні 299 не є проліном; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU.

28. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає домен Fc IgG1 людини, де домен Fc містить: залишок глутаміну в положенні амінокислоти 297 відповідно до нумерації EU; залишок глікозилизованого аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; амінокислоту в положенні 299 відповідно до нумерації EU; де вказана амінокислота в положенні 299 не є проліном; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU.

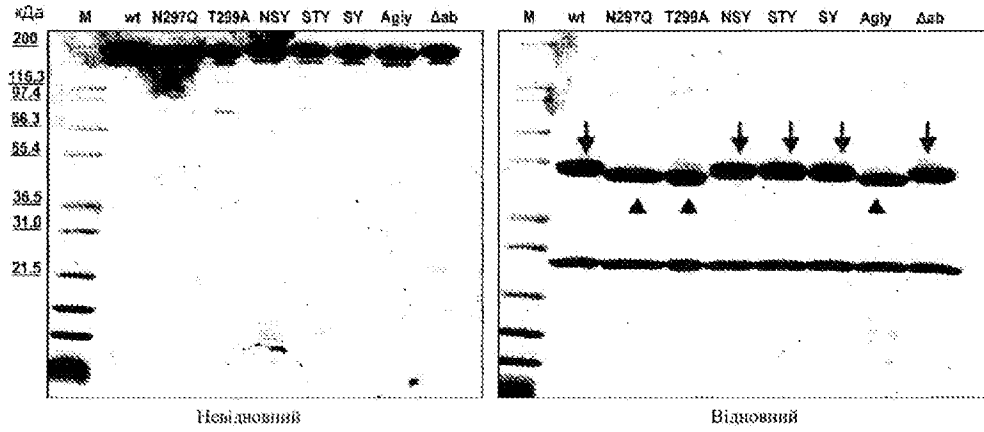
29. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає домен Fc IgG1 людини, де домен Fc містить: залишок аспарагіну в положенні амінокислоти 297 відповідно до нумерації EU; залишок глікозилизованого аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; залишок аланіну в положенні амінокислоти 299 відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU.

30. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що включає домен Fc IgG4 людини, де домен Fc містить: залишок глікозилизованого аспарагіну в положенні амінокислоти 298 відповідно до нумерації EU; залишок аспаргіну в положенні амінокислоти 299 відповідно до нумерації EU; і залишок серину або треоніну в положенні амінокислоти 300 відповідно до нумерації EU.

31. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 30, де домен Fc містить шарнірну область з мутацією Ser228Pro відповідно до нумерації EU.



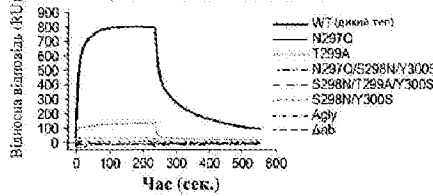
Фіг. 1



Фіг. 2

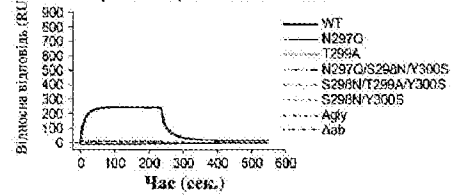
Повний масштаб: **CD16a-Phe158**

Зв'язування мутантів HEBE1 IgG проти αβTCR з FcγRIIIa-Val158 людини



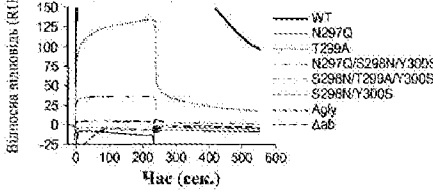
Повний масштаб: **CD16a-Phe158**

Зв'язування мутантів HEBE1 IgG проти αβTCR з FcγRIIIa-Val158 людини



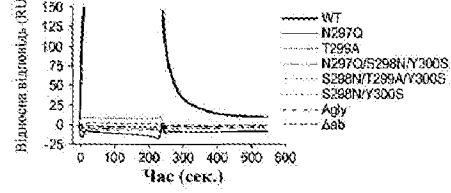
Масштабування:

Зв'язування мутантів HEBE1 IgG проти αβTCR з FcγRIIIa-Val158 людини



Масштабування:

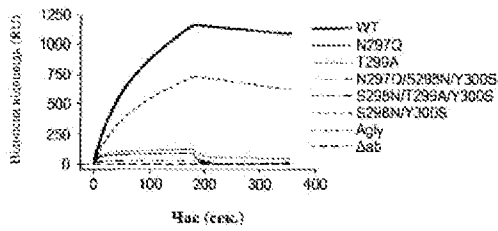
Зв'язування мутантів HEBE1 IgG проти αβTCR з FcγRIIIa-Val158 людини



Фіг. 3

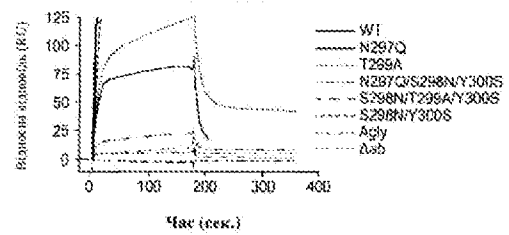
Повний масштаб:

Зв'язування мутантів HEBE1 IgG проти αβTCR з FcγRIIIa людини

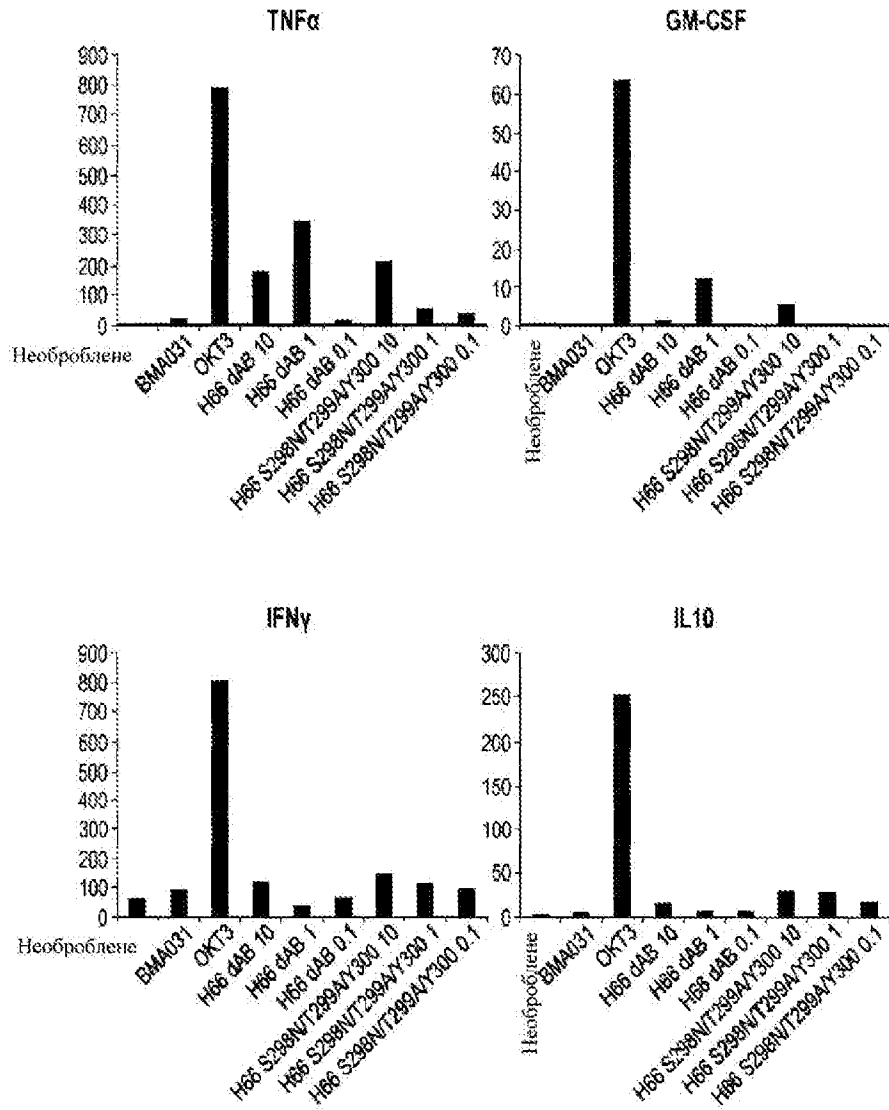


Масштабування:

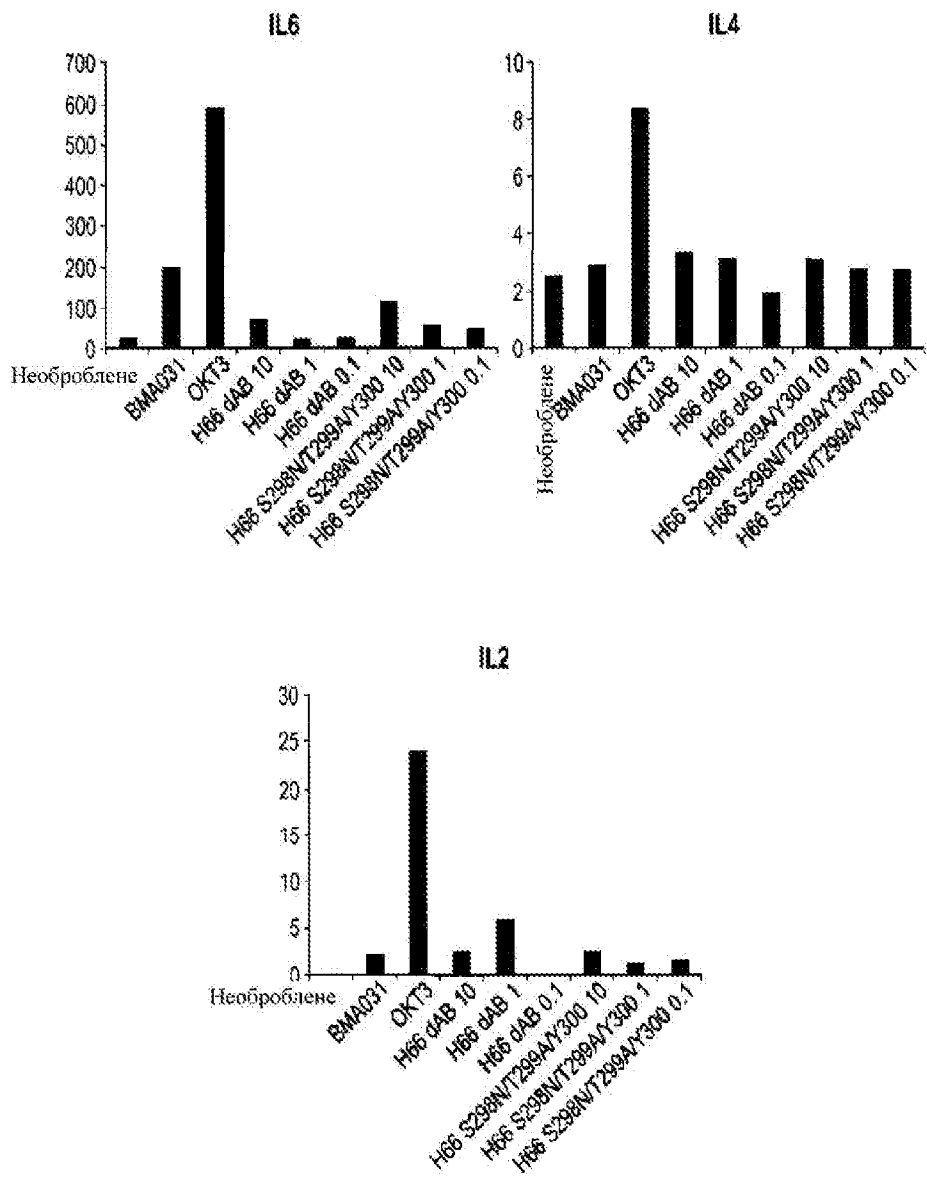
Зв'язування мутантів HEBE1 IgG проти αβTCR з FcγRIIIa людини



Фіг. 4



Фиг. 5



Фіг. 6

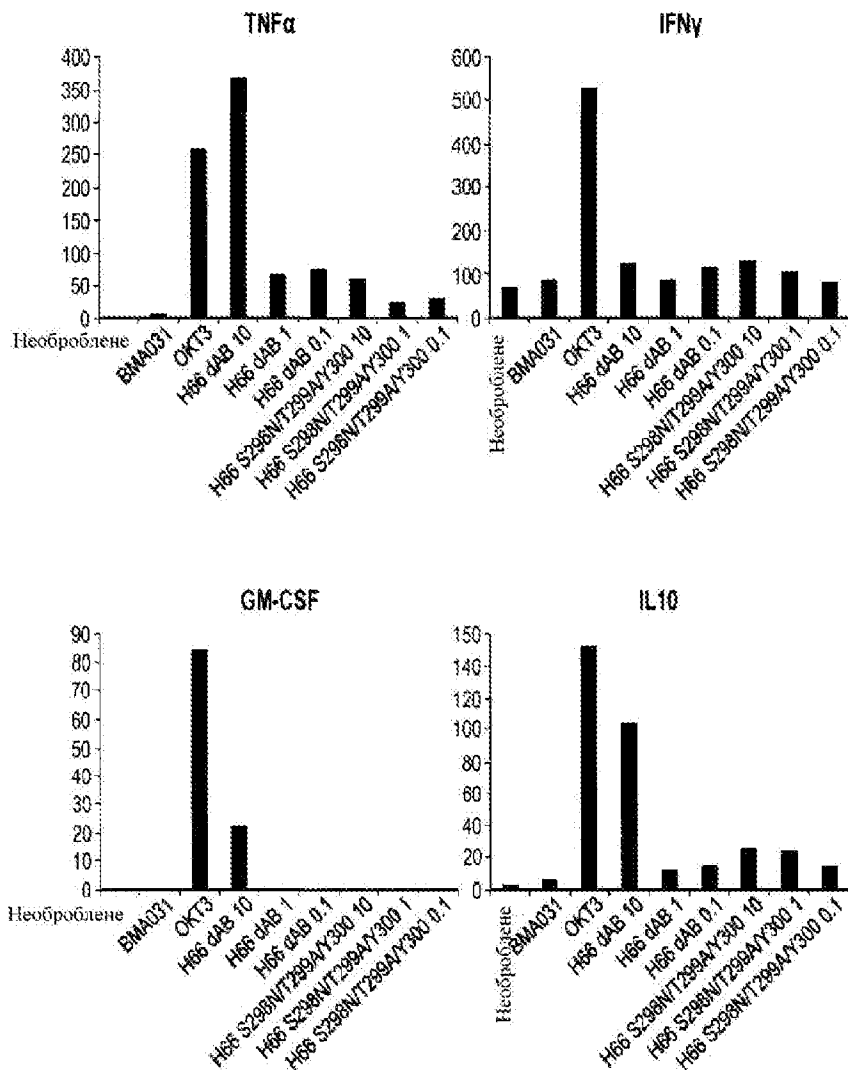
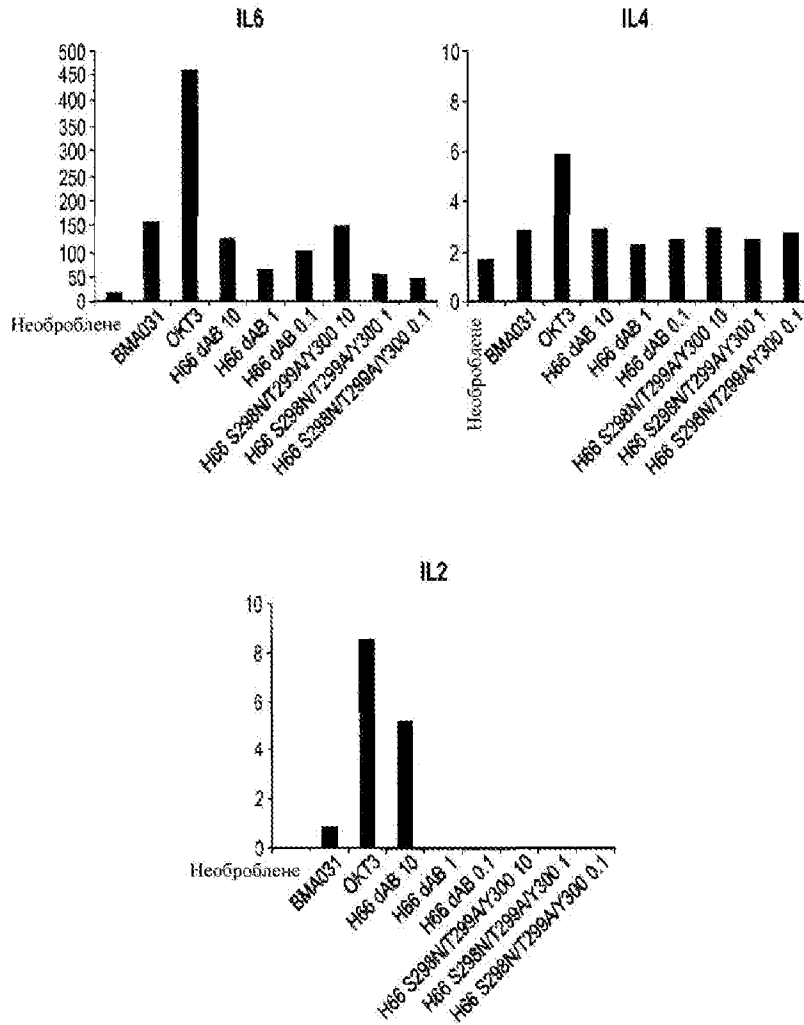
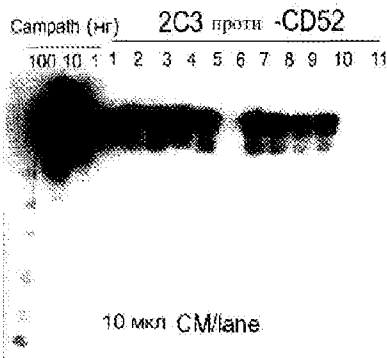


Fig. 7



Фіг. 8

A Вестерн-блотинг



- 1 - WT
- 2 - WT
- 3 - A114N
- 4 - Y436S
- 5 - Y436T
- 6 - S440N
- 7 - S442N
- 8 - NGT
- 9 - 298N/Y300S
- 10 - Імітаційна
- 11 - Середовища

B

Biacore

Невідоме	Конц. (мкг/мл)	Відносна відповідь (RU)	Розрах. конц. (M)	Розрах. конц. (мкг/мл)
2C3 у середовищах	3.00	855.75	2.45E-08	3.689
2C3 у середовищах	3.00	860.95	2.47E-08	3.710
2C3 у середовищах	3.00	866.89	2.51E-08	3.758
A114N		146.5	1.60E-09	0.240
Імітаційна		87.84	8.62E-10	0.129
NGT		124.52	1.30E-09	0.196
S298N/Y300S		112.14	1.19E-09	0.172
S440N		146.36	1.60E-09	0.240
S442N		121.21	1.26E-09	0.189
WT (Kalye)		148.41	1.63E-09	0.244
WT (Tim)		148.08	1.62E-09	0.244
Y436S		158.72	1.78E-09	0.267
Y436T		84.27	8.23E-10	0.123
Імітаційна у середовищах		87.38	8.57E-10	0.129

Фіг. 9

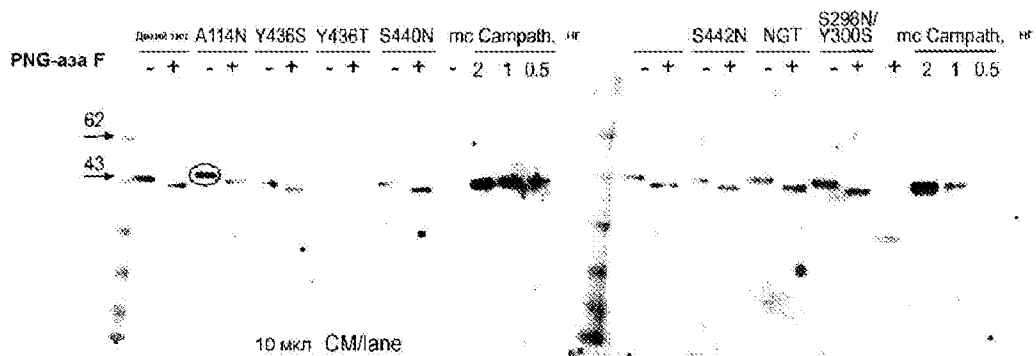


Fig. 10

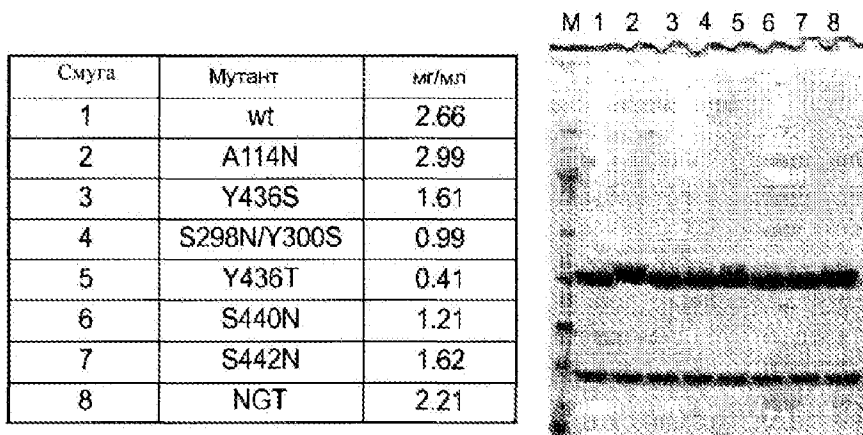
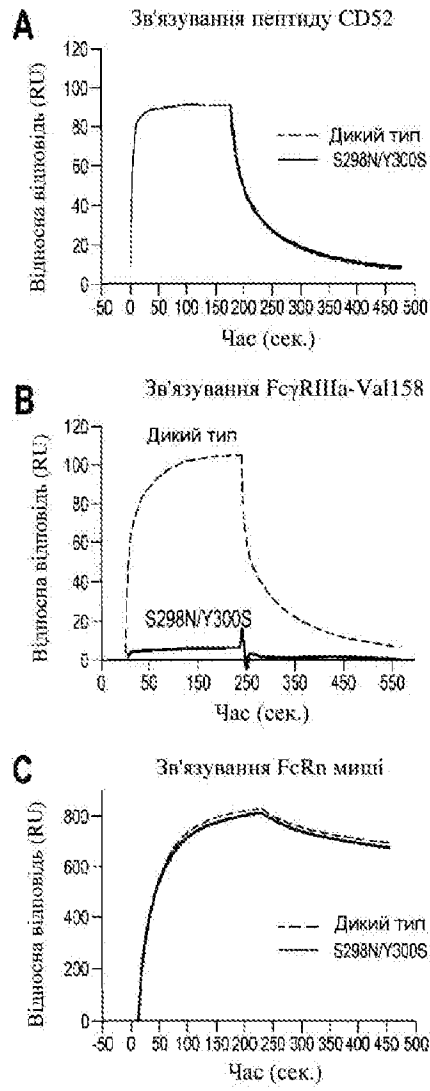
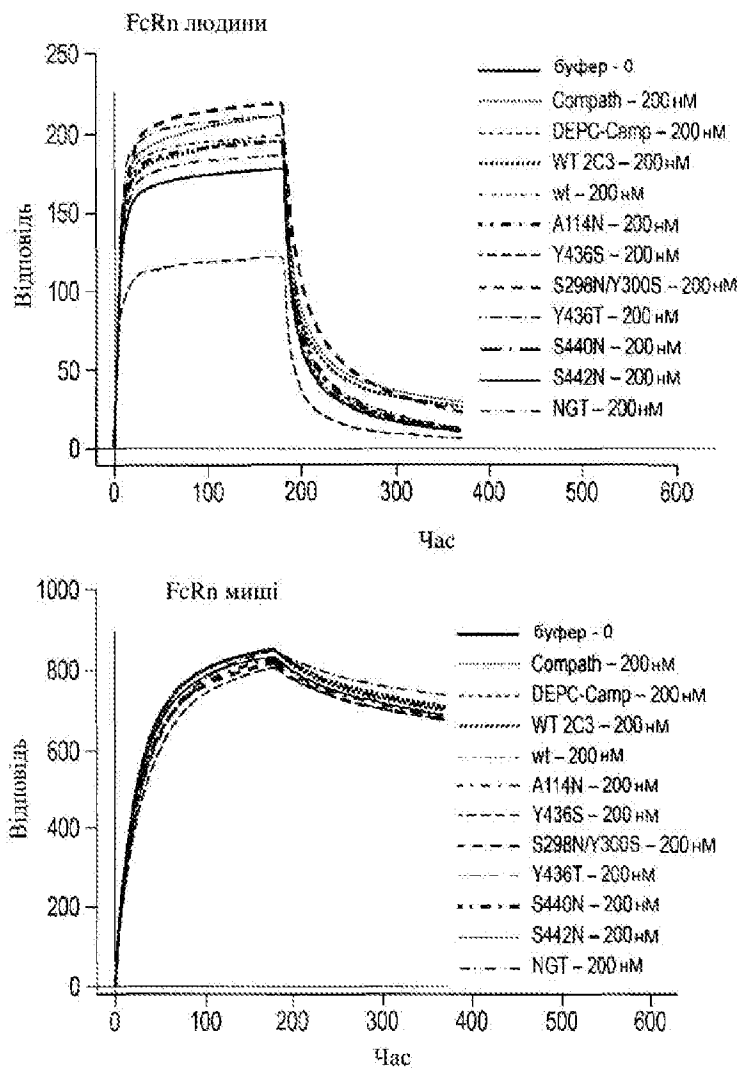


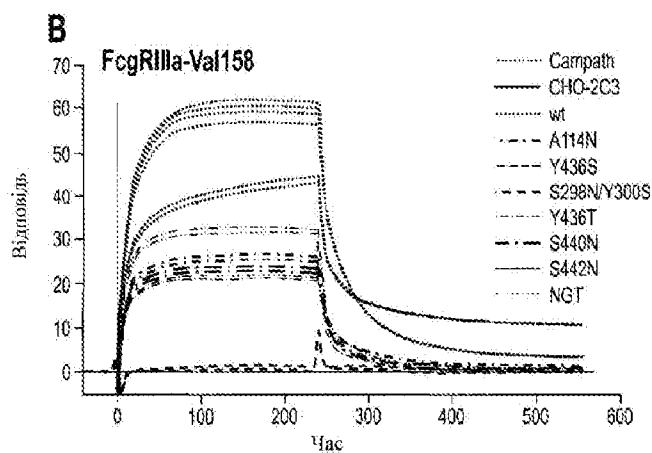
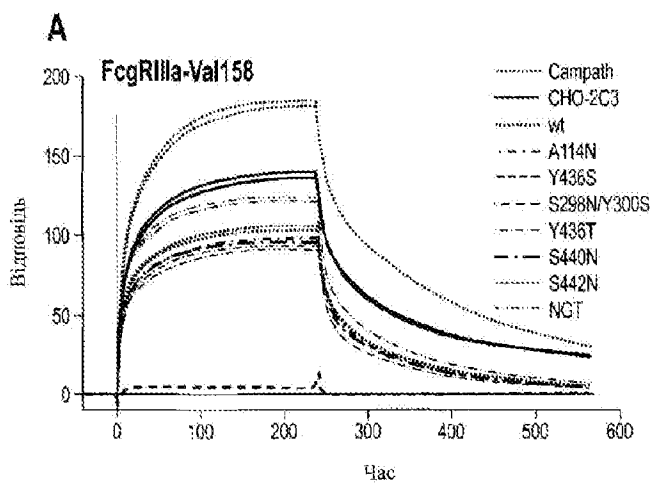
Fig. 11



Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14

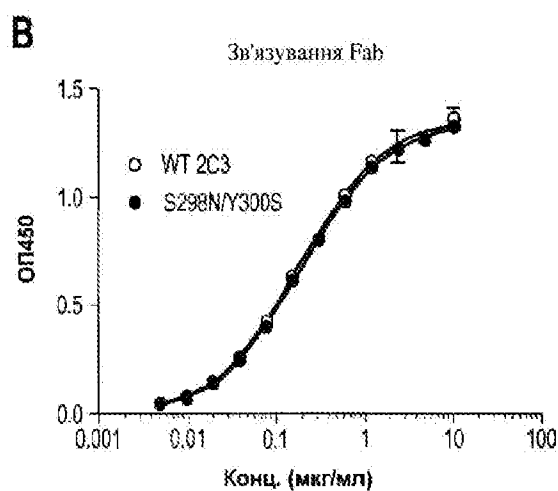
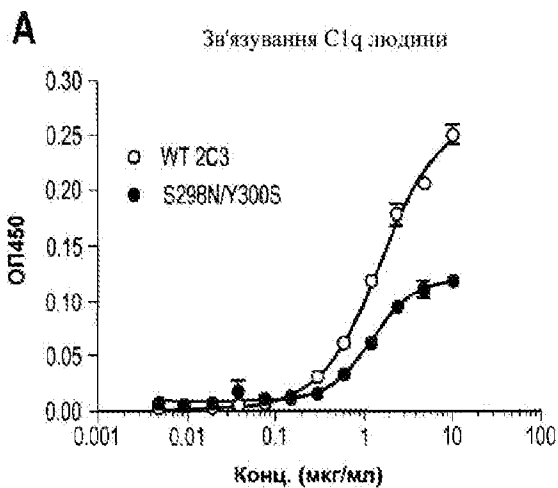


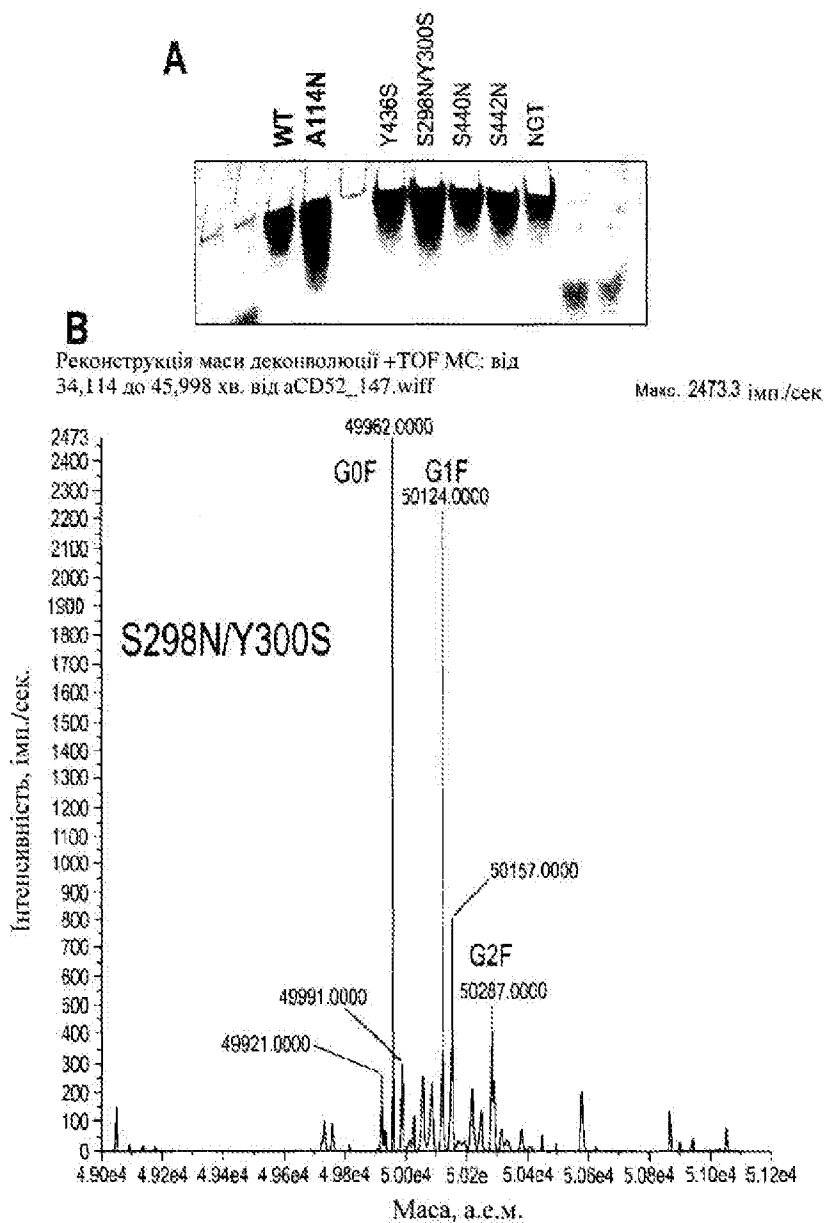
Fig. 15

Зразок	$k_a(\times 10^6/\text{мсек})$	$k_d(\times 10^{-2}/\text{сек})$	$R_{\text{max}}(\text{RU})$	$K_D(\text{нМ})$
GLD52	7.0	1.7	67.0	2.44
WT2C3	6.0	1.1	64.2	1.75
A114N	4.7	1.1	59.5	2.45
Y436S	5.9	1.0	66.9	1.73
S298N/Y300S	5.7	1.0	63.3	1.80
Y436T	4.8	0.9	65.7	1.95
S440N	5.8	1.1	66.8	1.84
S442N	5.7	1.1	66.2	1.85
NGT	7.9	1.1	70.2	1.35

Fig. 16

Зразок	K_{on} ($\times 10^6 M^{-1} сек^{-1}$)	K_{off} ($\times 10^{-2} сек^{-1}$)	KD (нМ)
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

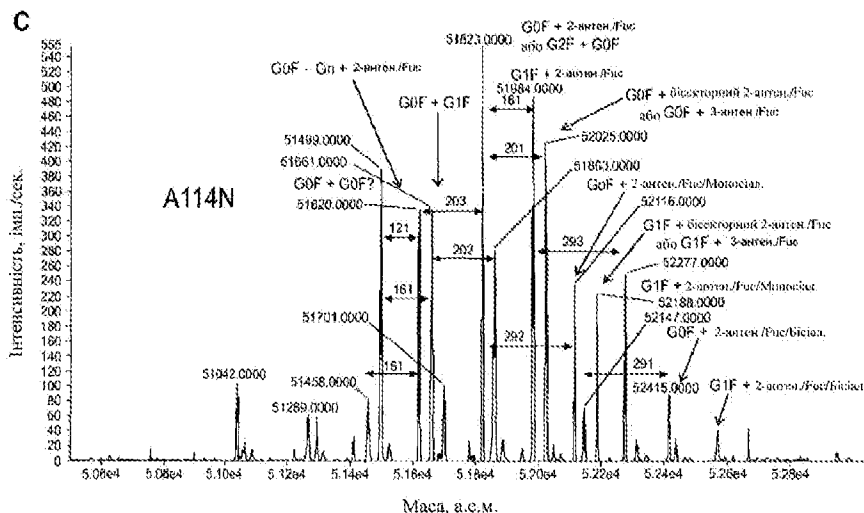
Фіг. 17



Фіг. 18

Реконструкція маси деконволюції +TOF MS: від 44,749 до 45,249 хв. від aCD52_148.wiff

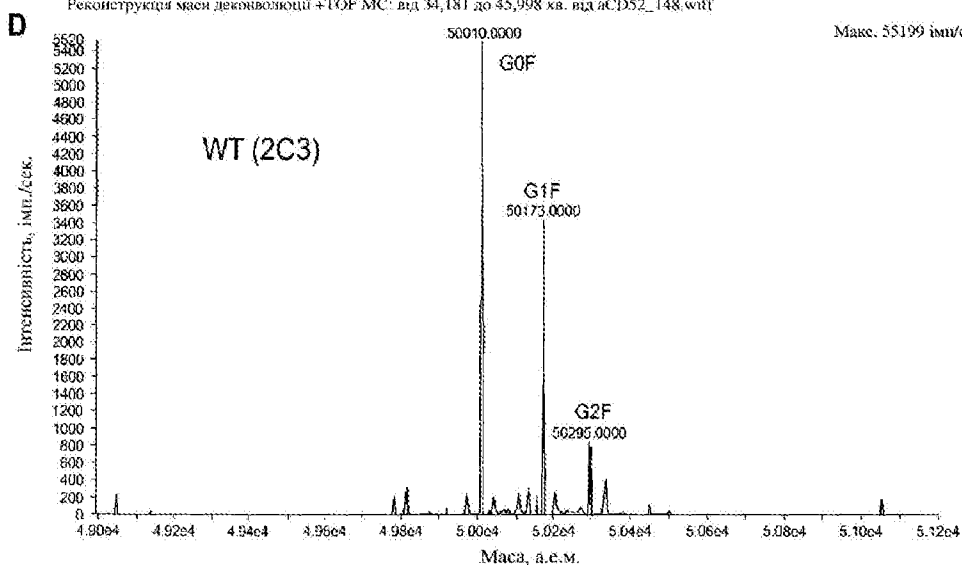
Мас. 554,5 імт/сек



Фіг. 18 (продовження)

Реконструкція маси деконволюції +TOF MS: від 34,181 до 45,998 хв. від aCD52_148.wiff

Мас. 55199 імт/сек

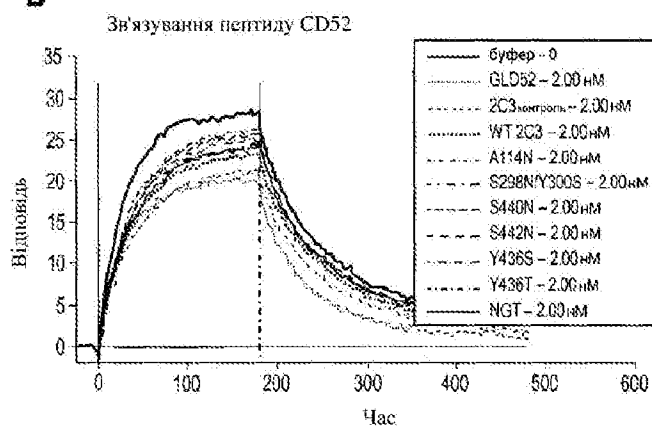


Фіг. 18 (продовження)

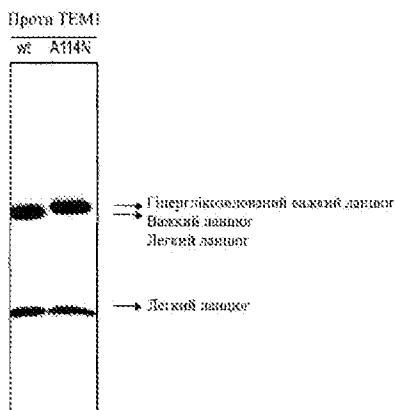
A

Зразок	Лот	Конц. Octet (мкг/мл)
Імітаційні середовища	11/23/2009	Занадто низька
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

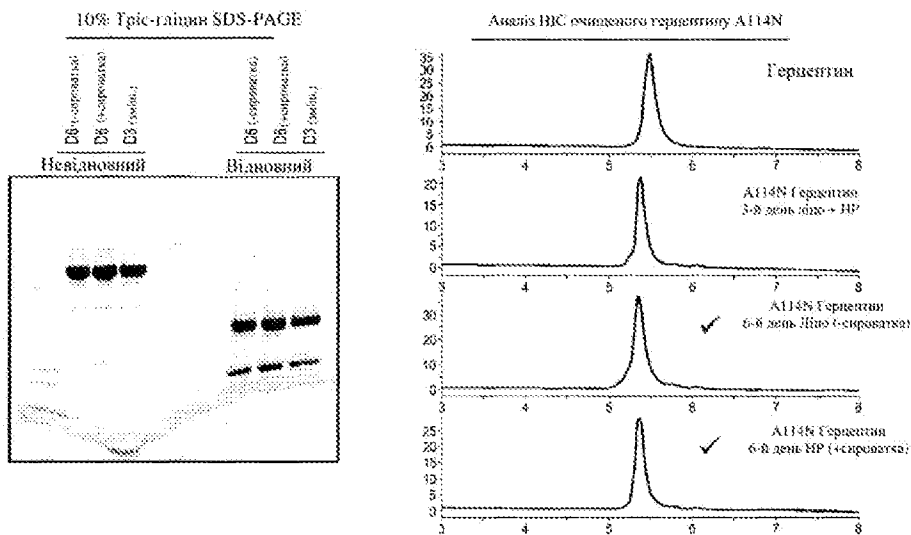
B



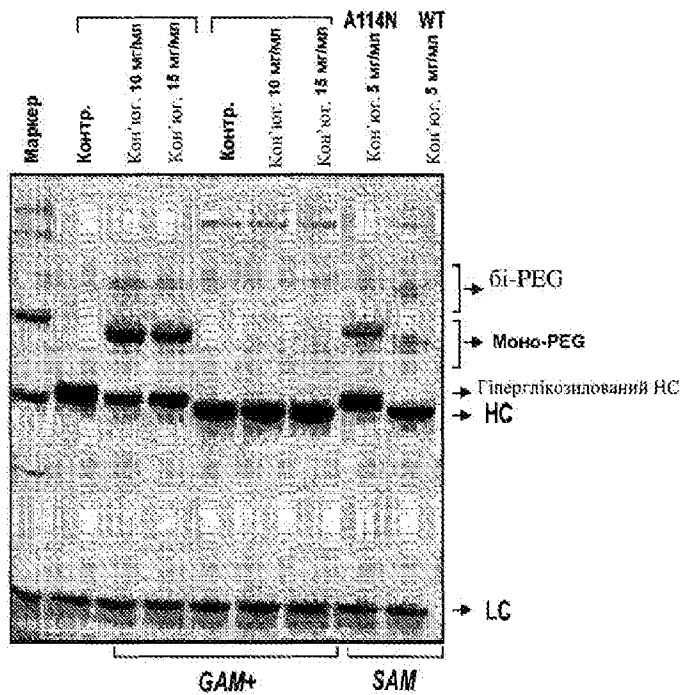
Фіг. 19



Фіг. 20



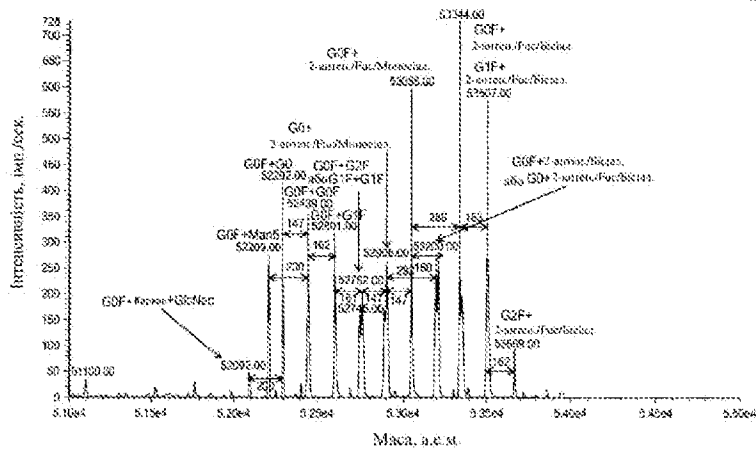
Фіг. 21



Фіг. 22

Реконструкція маси дезамінової +TOF MS: від 25,984 до 29,065 хв. від TEM_0065.wiff

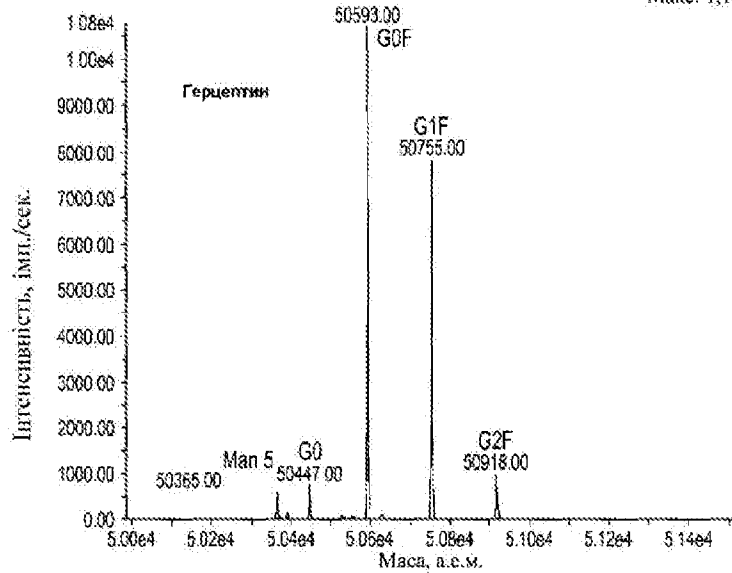
Макс. 1,8e4 імп/сек



Фіг. 23

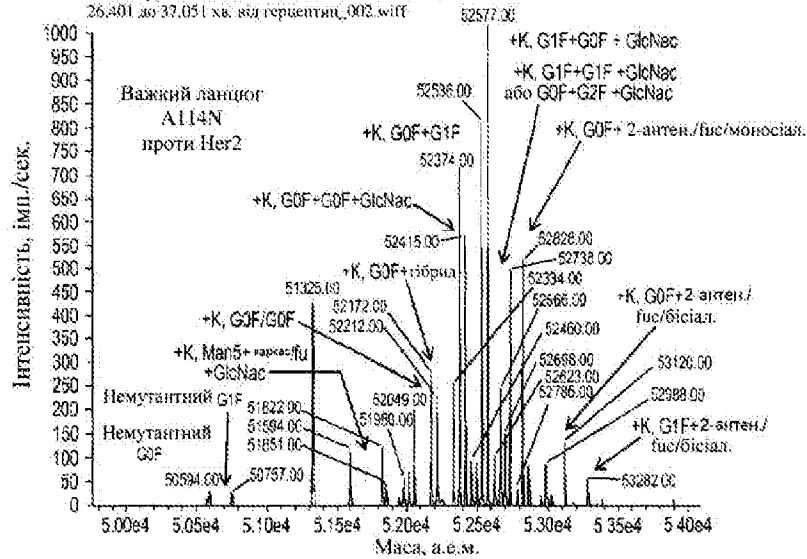
Реконструкція маси дезамінової +TOF MS: від 26,217 до 37,001 хв. від герцетин_001.wiff

Макс. 1,1e4 імп/сек



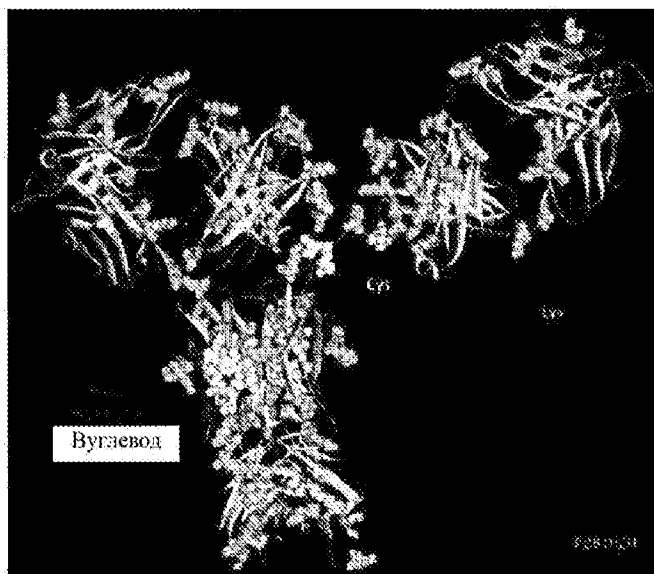
Реконструкція маси дезамінової +TOF MS: від 26,401 до 37,051 хв. від герцетин_002.wiff

Макс. 7231,3 імп/сек



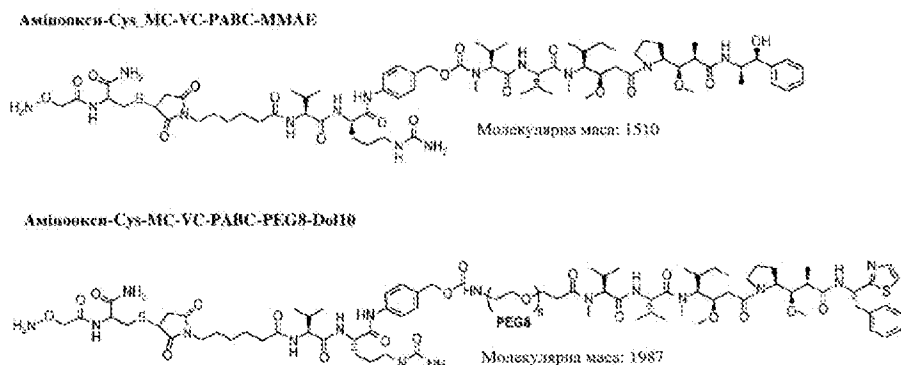
Фіг. 24

A

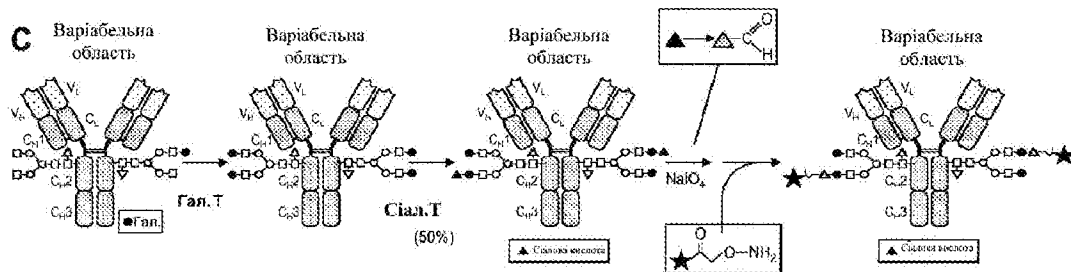


Фіг. 25

B

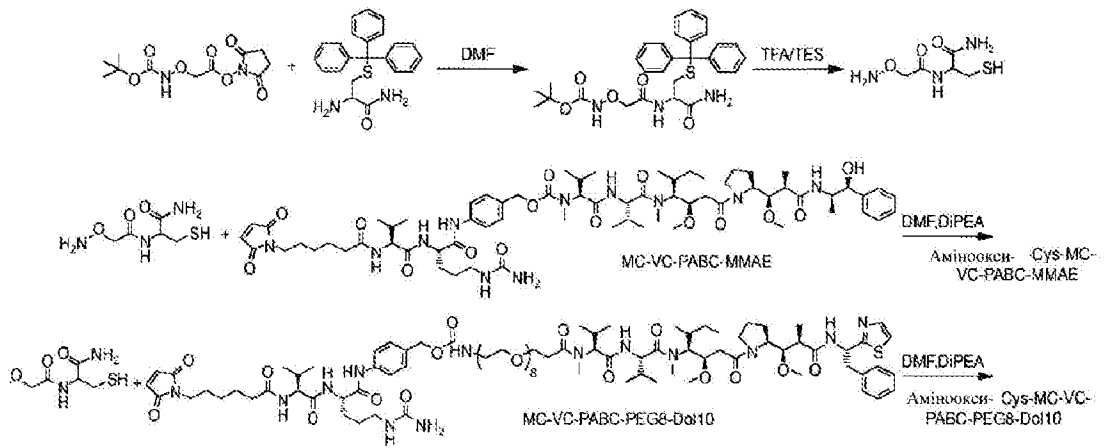


Фіг. 25 (продовження)

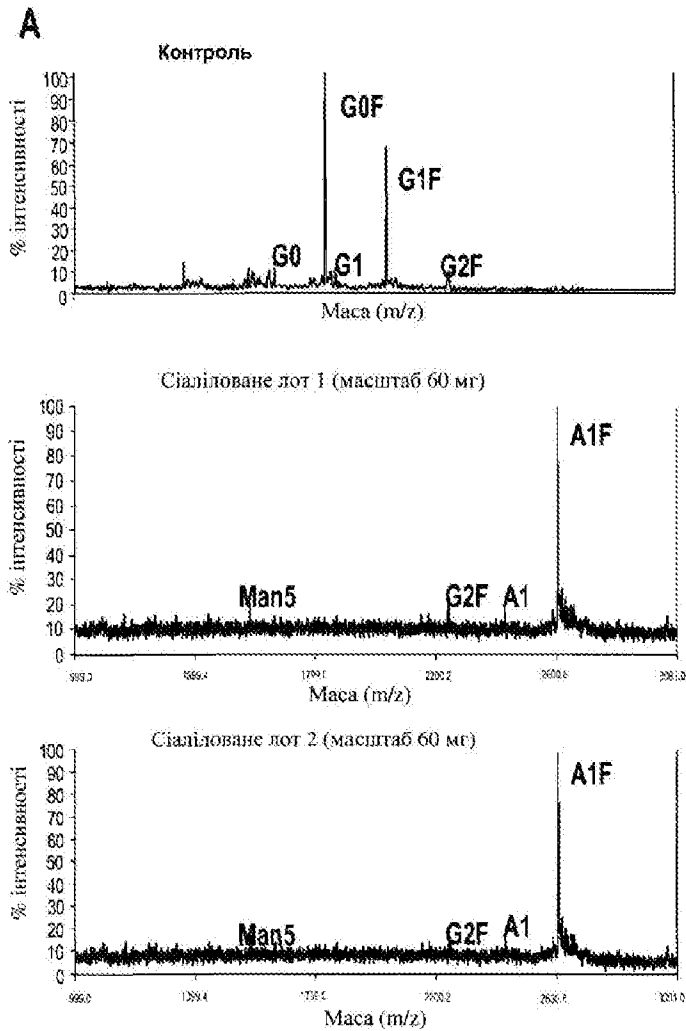


Фіг. 25 (продовження)

Синтез аміноокси-Сус-МС-VC-РАВС-ММАЕ і аміноокси-Сус-МС-VC-РАВС-РЕG8-До10



Фіг. 26

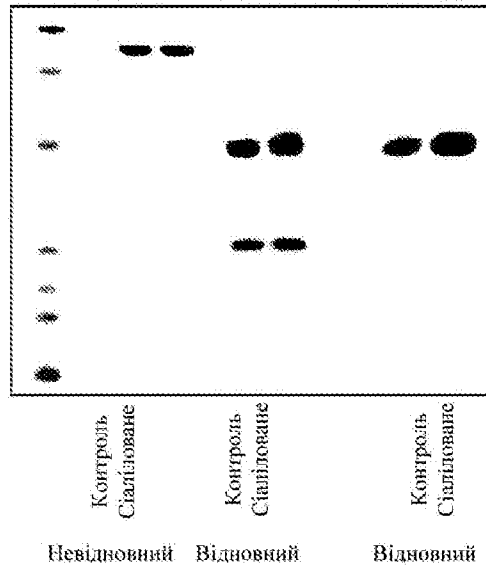


Фіг. 27

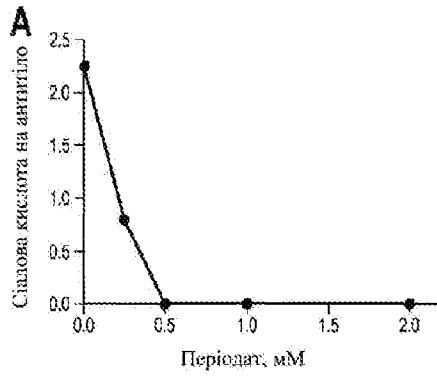
B

	Сіалова кислота, моль/моль
Контроль	0
Сіалізоване lot 1	2.2 ± 0
Сіалізоване lot 2	2.3 ± 0.1

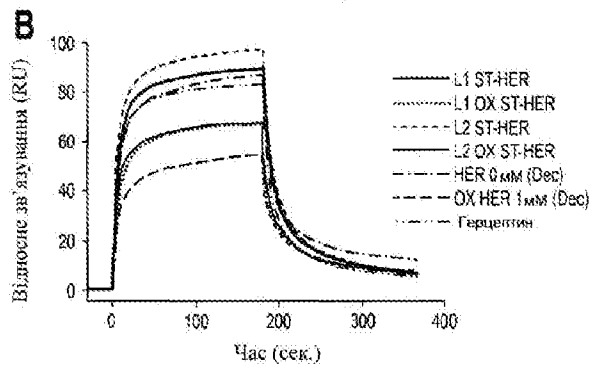
C



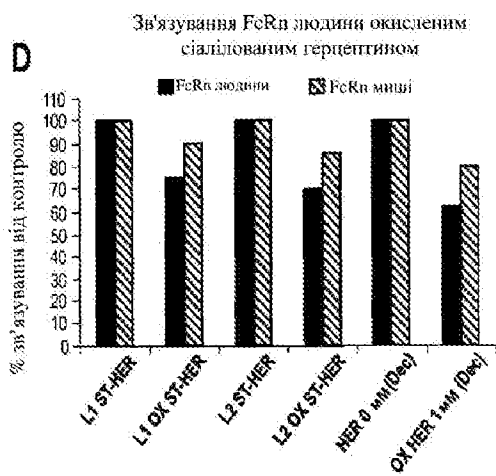
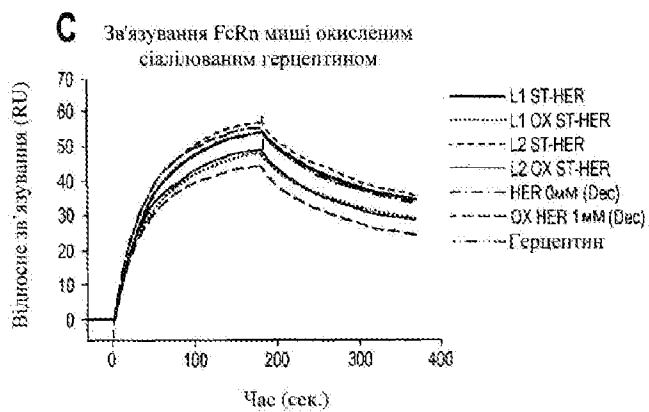
Фіг. 27
(продовження)



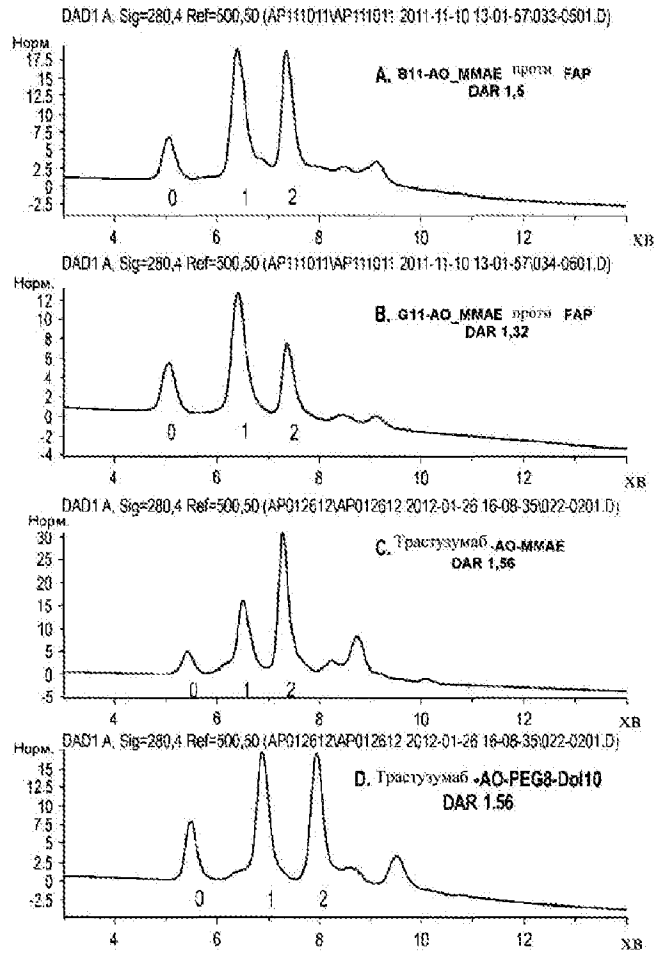
Зв'язування FcRn людини окисленим сіалованим герцептином



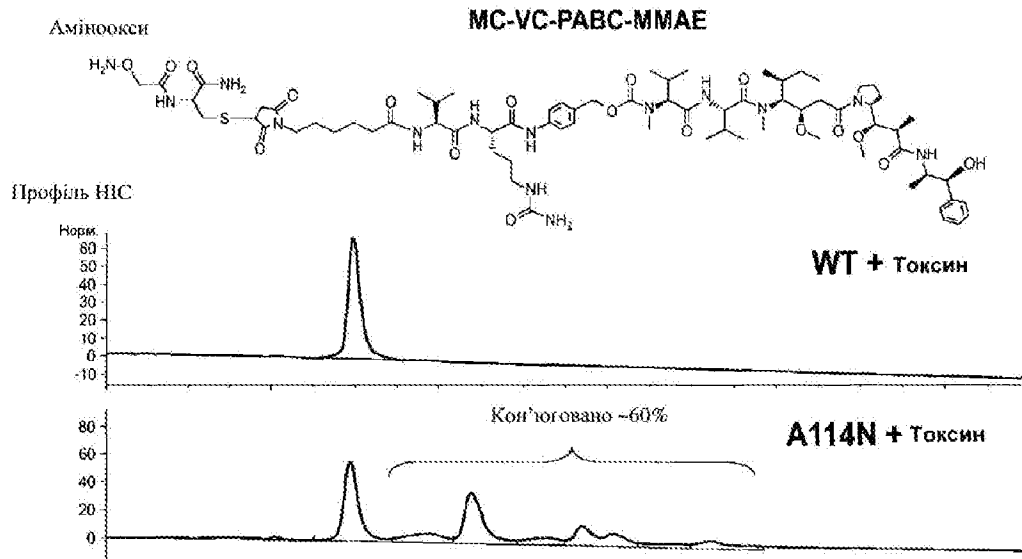
Фіг. 28



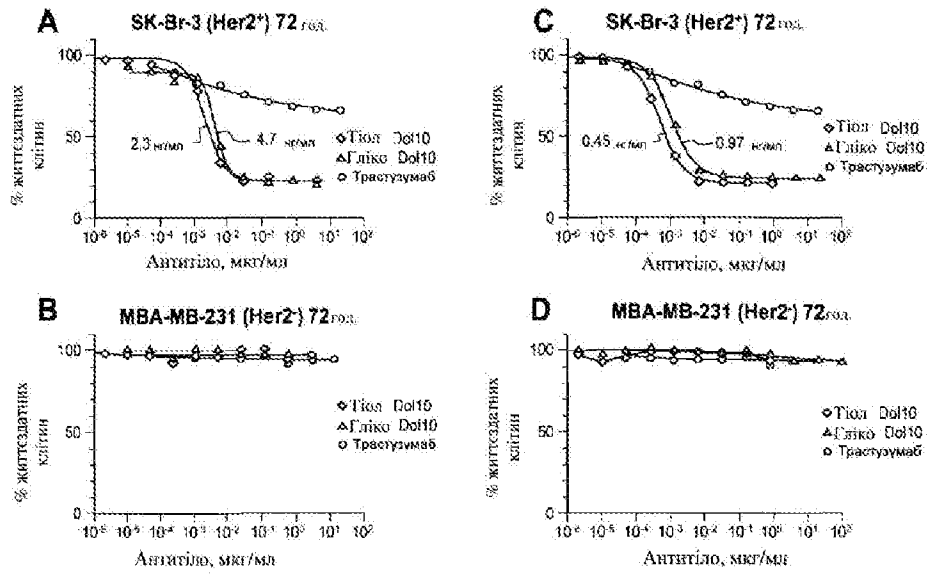
Фіг. 28 (продовження)



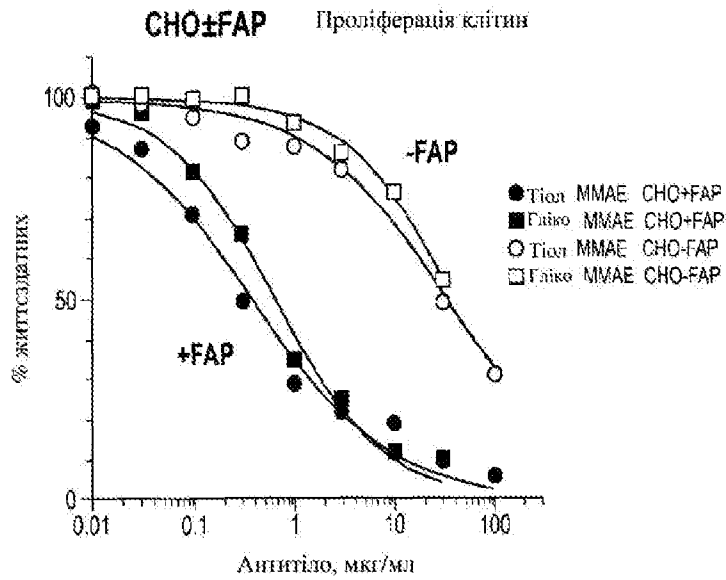
Фіг. 29



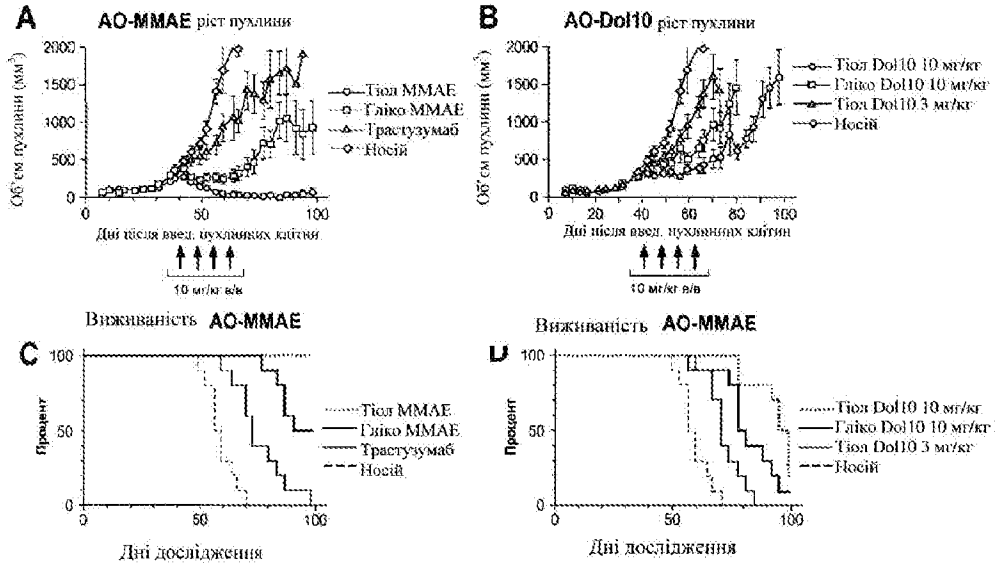
Фіг. 30



Фіг. 31

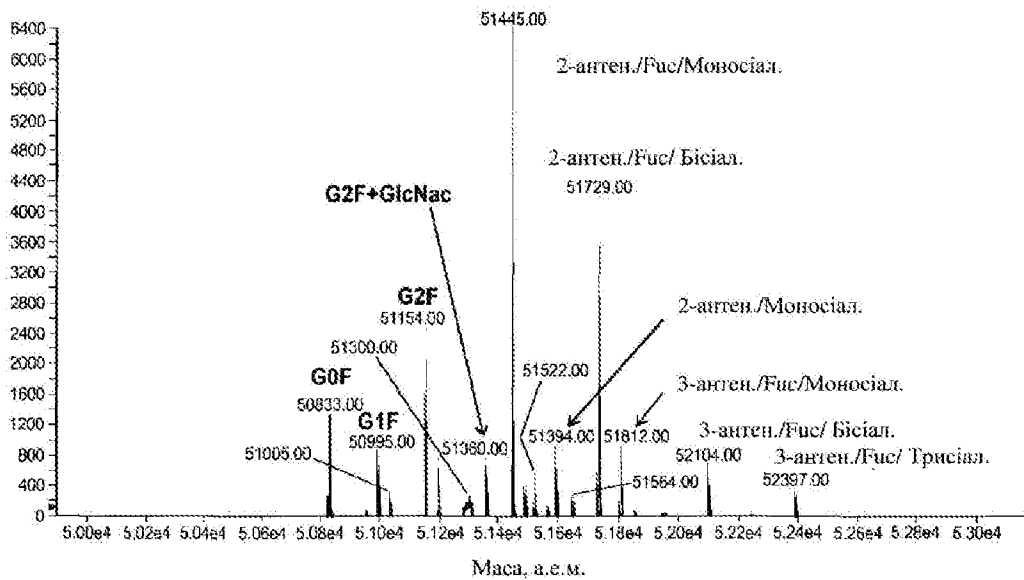


Фіг. 32

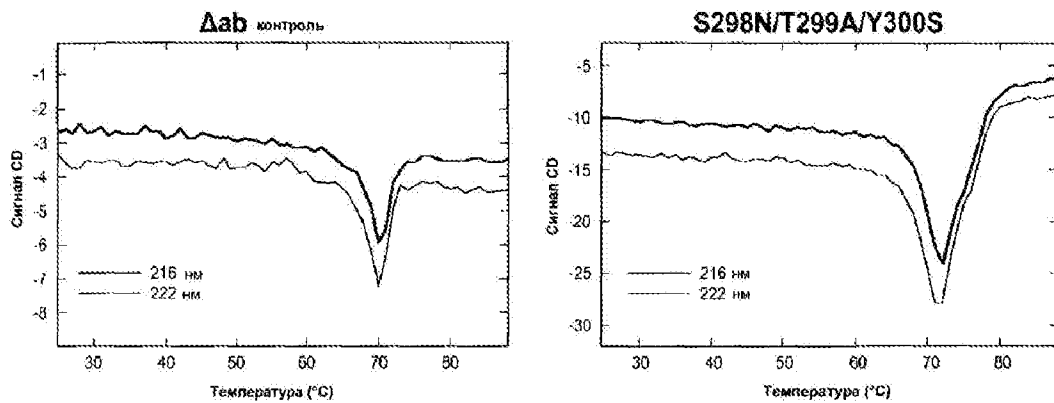


Фіг. 33

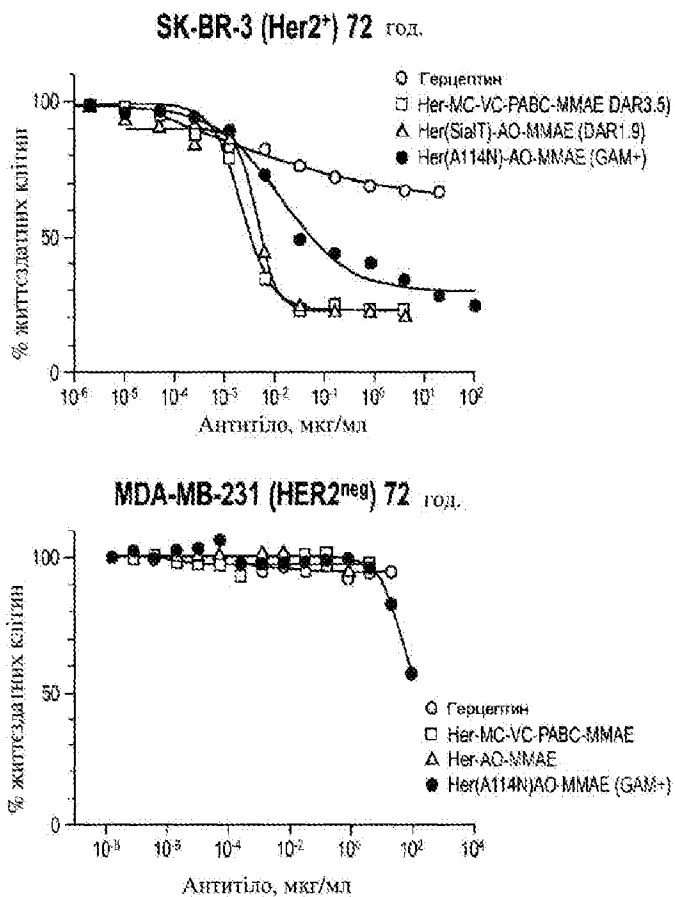
РХ/МС важкого ланцюга S298N/T299A/Y300S (NNAS)



Фіг. 34



Фіг. 35



Фіг. 36

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601