

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035987**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.09**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201590545**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.09.12**

### (54) ПОЛИПЕПТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ Fc С ИЗМЕНЕННЫМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ И СНИЖЕННОЙ АФФИННОСТЬЮ К Fc-ГАММА РЕЦЕПТОРАМ

(31) **PCT/EP2012/003819; 61/776,715**

(32) **2012.09.12; 2013.03.11**

(33) **EP; US**

(43) **2015.08.31**

(86) **PCT/US2013/059481**

(87) **WO 2014/043361 2014.03.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:  
**Пан Кларк, Цю Хуавэй (US)**

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

(56) **WO-A2-2004099249**

SHIELDS R.L. ET AL.: "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 276, no. 9, 2 March 2001 (2001-03-02), pages 6591-6604, XP002495886, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M009483200 [retrieved on 2000-11-28], tables I, IV

LABRIJN A.F. ET AL.: "When binding is enough: nonactivating antibody formats", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 20, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 479-485, XP025771207, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/J.COI.2008.05.010 [retrieved on 2008-07-09], page 481, left-hand column - page 482, right-hand column; figure 2

ZHOU QUIN ET AL.: "Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 99, no. 3, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 652-665, XP009137262, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.21598

CHAN ANDREW C. ET AL.: "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, vol. 10, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 301-316, XP002665072, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/NRI2761, cited in the application

(57) Изобретение относится к выделенному антителу или иммуноадгезину, содержащим домен Fc IgG1 с измененным гликозилированием, и к их вариантам, к выделенному полинуклеотиду, кодирующему указанное антитело или иммуноадгезин, к вектору экспрессии, включающему этот полинуклеотид, к клетке-хозяину для продукции указанного антитела или иммуноадгезина, к способу получения указанного антитела или иммуноадгезина.

**B1****035987****035987****B1**

### Родственные заявки

В заявке на данное изобретение испрашивается приоритет международной патентной заявки № PCT/EP2012/003819, озаглавленной "Антитела против альфа-бета TCR", поданной 12 сентября 2012 г., и предварительной заявки США 61/776715, озаглавленной "Полипептиды, содержащие Fc с измененным гликозилированием и сниженной эффекторной функцией", поданной 11 марта 2013 г.

Эта заявка также относится к предварительной заявке США 61/776724, озаглавленной "Сайт-специфическое антитело, конъюгированное с лекарством с помощью сконструированного гликозилирования", поданной 11 марта 2013 г., и к предварительной заявке США 61/776710, озаглавленной "Гипергликозилированные связывающие полипептиды", поданной 11 марта 2013 г. Содержание вышеуказанных заявок включено в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

### Известный уровень техники

Антитела с пониженным гликозилированием Fc или отсутствием гликозилирования Fc использовались для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний или нарушений с тем, чтобы уменьшить побочные эффекты или токсичность, связанные с нежелательной эффекторной функцией (см., например, Chan and Carter, Nat. Reviews Immunology, 2010). Тем не менее гликозилирование Fc-домена антитела важно для структуры антитела, стабильности и функции, и отсутствие гликозилирования может привести к антителам с ухудшенными биофизическими свойствами.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в конструировании связывающих белков с пониженной эффекторной функцией, но которые сохраняют, однако, желаемые свойства гликозилированного Fc-домена.

### Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении по сравнению с предшествующим уровнем техники предлагаются улучшенные связывающие полипептиды (например, антитела или гибриды) и необязательно их конъюгаты с лекарствами, включающие домен Fc с измененным гликозилированием и сниженной эффекторной функцией. В иллюстративных вариантах осуществления домен Fc включает остаток аспарагина в положении аминокислоты 298 в соответствии с нумерацией EU и остаток серина или треонина в положении аминокислоты 300 в соответствии с нумерацией EU. В настоящем изобретении предлагаются также нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие полипептиды, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения таких антигенсвязывающих полипептидов. Предлагаются также способы применения антигенсвязывающих полипептидов, раскрытых в настоящем документе, для лечения заболевания.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что связывающие полипептиды (например, антитела) по настоящему изобретению характеризуются измененными профилями гликозилирования, что дает преимущество в том, что они аннулируют связывание связывающего полипептида с рецепторами Fc $\gamma$ , тем самым изменяя эффекторную функцию связывающего полипептида при сохранении желаемых биофизических свойств, которые предоставляются гликозилированием. Кроме того, сконструированный сайт N-связанного гликозилирования в положении аминокислоты 298 также может быть использован в качестве сайта для конъюгации эффекторных частей, таких как цитотоксические лекарства.

Соответственно, в одном аспекте в данном изобретении предлагается выделенный связывающий полипептид, включающий домен Fc с измененным гликозилированием, в котором домен Fc включает остаток аспарагина в положении аминокислоты 298 в соответствии с нумерацией EU и остаток серина или треонина в положении аминокислоты 300 в соответствии с нумерацией EU, где связывающий полипептид проявляет сниженную эффекторную функцию в результате указанного измененного гликозилирования. В одном варианте осуществления связывающий полипептид дополнительно включает остаток аланина в положении аминокислоты 299 в соответствии с нумерацией EU. В другом варианте осуществления связывающий полипептид дополнительно включает остаток глутамина в положении аминокислоты 297 в соответствии с нумерацией EU. В одном варианте осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG1. В другом варианте осуществления домен Fc происходит от человека.

В одном варианте осуществления боковая цепь остатка аспарагина связана с гликаном через  $\beta$ -гликозиламидные связи. В другом варианте осуществления гликан представляет собой 2-антенарный гликан. В другом варианте осуществления гликан представляет собой природную гликоформу млекопитающих.

В другом варианте осуществления связывающий полипептид имеет более низкую аффинность к рецептору Fc $\gamma$ , чем связывающий полипептид, имеющий нативный домен Fc. В одном варианте осуществления рецептор Fc $\gamma$  представляет собой Fc $\gamma$ RI и/или Fc $\gamma$ RIIIa. В другом варианте осуществления связывающий полипептид имеет сродство к рецептору FcRn, сходное со связывающим полипептидом, имеющим нативный домен Fc.

В другом варианте осуществления гликан включает реакционноспособную альдегидную группу. В другом варианте осуществления гликан включает окисленный остаток сахара, включающий реакционноспособную альдегидную группу. В другом варианте осуществления окисленный остаток сахара представляет собой концевую сиаловую кислоту или галактозу.

В другом варианте осуществления гликан связан с эффекторной частью. В другом варианте осуществления эффекторная часть представляет собой цитотоксин. В другом варианте осуществления цитотоксин выбран из группы цитотоксинов, перечисленных в табл. 1. В другом варианте осуществления эффекторная часть представляет собой детектирующий агент. В другом варианте осуществления эффекторная часть связана через оксимную или гидразонную связь с остатком сахара гликана. В другом варианте осуществления остаток сахара представляет собой концевую сиаловую кислоту или остаток галактозы гликана. В другом варианте осуществления эффекторная часть включает рН-чувствительный линкер, дисульфидный линкер, чувствительный к ферменту линкер или другую расщепляемую линкерную часть. В другом варианте осуществления эффекторная часть включает линкерную часть, выбранную из группы линкерных частей, представленных в табл. 2 или 14.

В определенных вариантах осуществления связывающий полипептид представляет собой антитело или иммуноадгезин.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается выделенный связывающий полипептид, включающий домен Fc, где домен Fc включает свободный остаток аспарагина в положении аминокислоты 298 в соответствии с нумерацией EU и свободный остаток серина или треонина в положении аминокислоты 300 в соответствии с нумерацией EU.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается выделенный связывающий полипептид, включающий домен Fc, где домен Fc включает модифицированный остаток аспарагина в положении аминокислоты 298 в соответствии с нумерацией EU и свободный остаток серина или треонина в положении аминокислоты 300 в соответствии с нумерацией EU.

В другом варианте осуществления эффекторная часть связана через боковую цепь модифицированного остатка аспарагина с остатком сахара гликана. В одном варианте осуществления сахарид представляет собой концевую сиаловую кислоту или остаток галактозы гликана. В одном варианте осуществления эффекторная часть связана через оксимную или гидразонную связь с остатком сахара гликана. В одном варианте осуществления сахарид представляет собой концевую сиаловую кислоту или остаток галактозы гликана. В другом варианте осуществления модифицированный остаток аспарагина связан с эффекторной частью лекарства с образованием конъюгата антитело-лекарство (ADC).

В другом аспекте композиция включает связывающий полипептид по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к лечению нуждающегося в этом больного, включающему введение эффективного количества композиции согласно изобретению.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий полипептид согласно изобретению. В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, включающему полинуклеотид, или к клетке-хозяину, включающей полинуклеотид или вектор.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ получения связывающего полипептида, включающий экспрессию полинуклеотида или вектора в клетке.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 представляет собой схематическую иллюстрацию синтеза конъюгата антитело-лекарство, где часть токсина связана с остатком окисленной сиаловой кислоты гликана антитела с использованием оксимной связи.

Фиг. 2 представляет собой гель, окрашенный кумасси синим, демонстрирующий экспрессию и очистку мутантов гликозилирования.

На фиг. 3 приведены результаты экспериментов с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используемого для оценки связывания мутантных антител HEBE1 IgG против  $\alpha\beta$ TCR с рекомбинантным человеческим Fc $\gamma$ RIIIa (V158 & F158).

На фиг. 4 приведены результаты экспериментов с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используемого для оценки связывания мутантных антител HEBE1 IgG против  $\alpha\beta$ TCR с рекомбинантным человеческим Fc $\gamma$ RI.

На фиг. 5 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN $\gamma$  и IL-10 в присутствии мутантных антител против  $\alpha\beta$ TCR (2 день).

На фиг. 6 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для IL6, IL-4 и IL-2 в присутствии мутантных антител против  $\alpha\beta$ TCR (2 день).

На фиг. 7 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN $\gamma$  и IL-10 в присутствии мутантных антител против  $\alpha\beta$ TCR (4 день).

На фиг. 8 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для IL6, IL-4 и IL-2 в присутствии мутантных антител против  $\alpha\beta$ TCR (4 день).

На фиг. 9 представлены результаты экспериментов по исследованию уровня экспрессии мутантов 2C3 с помощью вестерн-блоттинга и поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 10 показаны результаты экспериментов по исследованию гликозилирования мутантов 2C3 до и после обработки PNG-азой F.

На фиг. 11 приведены результаты экспериментов по исследованию с помощью SDS-PAGE сайтов гликозилирования мутантов 2С3, выделенных из культуры клеток.

На фиг. 12 представлены результаты экспериментов с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используемых для оценки связывания модифицированного антитела против CD-52 с рекомбинантным человеческим FcγRIIIa (V158). Антитело против CD-52, включающее мутации S298N/Y300S в домене Fc, использовали для оценки эффекторной функции модифицированной молекулы.

Связывание с пептидом CD-52 (A), связывание с FcγRIIIa (V158, B) и контрольное связывание с FcRn мыши (C).

На фиг. 13 изображены результаты экспериментов по исследованию с помощью поверхностного плазмонного резонанса связывающих свойств Fc мутантов 2C3.

На фиг. 14 изображены результаты экспериментов по исследованию с помощью поверхностного плазмонного резонанса связывания модифицированного антитела против CD-52 с обоими FcγRIIIa (Val158) (как указано выше) и FcγRIIIa (Phe158). Антитела против CD-52, включающие мутации S298N/Y300S в домене Fc, использовали для оценки эффекторной функции связывания модифицированной молекулы с FcγRIIIa (Val158, фиг. 14A) и FcγRIIIa (Phe58, фиг. 14B).

На фиг. 15 изображен анализ связывания Clq с мутантом S298N/Y300S и контролем WT 2C3 (A) и результаты анализа ELISA, подтверждающих эквивалентное покрытие лунок.

На фиг. 16 изображены результаты экспериментов с помощью поверхностного плазмонного резонанса по измерению кинетики связывания мутантов 2C3 с пептидом 741 CD-52.

На фиг. 17 изображены результаты экспериментов с помощью поверхностного плазмонного резонанса, сравнивающие аффинность связывания антигена антителом WT против CD-52, 2C3 и гипергликозилированным мутантом A114N.

На фиг. 18 приведены результаты экспериментов по характеристике заряда с помощью изоэлектрического фокусирования и масс-спектрометрии для определения содержания гликанов в мутантах 2С3.

На фиг. 19 изображены результаты по концентрации (Octet) и результаты экспериментов с помощью поверхностного плазмонного резонанса, сравнивающие аффинность связывания антигена антителами WT против CD-52, 2C3 и мутантными антителами.

На фиг. 20 изображены результаты экспериментов с помощью SDS-PAGE по определению содержания гликанов в мутанте A114N против TME1.

На фиг. 21 изображены результаты, полученные с помощью SDS-PAGE и хроматографического анализа с гидрофобным взаимодействием, мутанта A114N против Her-2.

На фиг. 22 изображены результаты экспериментов с помощью SDS-PAGE, демонстрирующие конъюгацию ПЭГ с мутантом A114N 2C3 через аминоксисвязь.

На фиг. 23 изображены результаты экспериментов с помощью ЖХ-МС по определению содержания гликанов в гипергликозилированном мутанте A114N против TEM1.

На фиг. 24 изображены результаты экспериментов с помощью ЖХ-МС по определению содержания гликанов в антителе против Her2 дикого типа и гипергликозилированном мутанте A114N против Her-2.

На фиг. 25 изображен иллюстративный способ осуществления сайт-специфической конъюгации антитела в соответствии с методами согласно изобретению.

На фиг. 26 изображен синтез иллюстративных эффекторных частей по изобретению: аминокис-  
Cys-MC-VC-PABC-MMAE и аминокис-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10.

На фиг. 27 представлена информация по характеристике сialiлированного антитела против Her2.

На фиг. 28 представлена информация по характеристике окисленного сиаилированного антитела против Her2.

На фиг. 29 представлены хроматограммы гидрофобного взаимодействия гликоконъюгатов, полученных с тремя различными силлированными антителами с двумя различными аминоксигруппами.

На фиг. 30 представлена хроматограмма НИС гликозилированного мутантного конъюгата A114 с АО-ММАЕ против Her-2, полученного с использованием химических методов GAM(+).

Фиг. 31 иллюстрирует сравнение эффективности *in vitro* гликоконъюгата и тиолового конъюгата против Her2.

Фиг. 32 иллюстрирует сравнение эффективности *in vitro* гликоконъюгата и тиолового конъюгата B11 против FAP.

На фиг. 33 показано сравнение эффективности *in vivo* гликоконъюгатов и тиоловых конъюгатов против Her2 в модели ксенотрансплантата опухолевых клеток Her-2+.

На фиг. 34 изображены результаты экспериментов с помощью ЖХ-МС по определению содержания гликанов мутантного антитела против  $\alpha\beta$ TCR, содержащего мутацию S298N/Y300S.

На фиг. 35 представлены результаты экспериментов с помощью кругового дихроизма по определению относительной термической стабильности антитела против  $\alpha\beta$ TCR дикого типа и мутантного антитела против  $\alpha\beta$ TCR, содержащего мутацию S298N/Y300S.

На фиг. 36 изображены результаты анализа влияния на клеточную пролиферацию ADC, полученного из антитела против HER, несущего гипергликозилирующую мутацию A114N, и AO-MMAE.

### Подробное описание

В настоящем изобретении предлагаются связывающие полипептиды (например, антитела) и их конъюгаты с лекарствами, включающие домен Fc, где домен Fc включает остаток аспарагина в положении аминокислоты 298 в соответствии с нумерацией EU и остаток серина или треонина в положении аминокислоты 300 в соответствии с нумерацией EU. В настоящем изобретении предлагаются также нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие полипептиды, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения таких антигенсвязывающих полипептидов. Предлагаются также способы применения антигенсвязывающих полипептидов, раскрытых в настоящем документе, для лечения заболевания.

### I. Определения

При применении в настоящем документе термин "связывающий полипептид" или "полипептид, связывающий" должен относиться к полипептиду (например, антителу), который содержит по меньшей мере один сайт связывания, отвечающий за селективное связывание с представляющим интерес антигеном-мишенью (например, с антигеном человека). Примеры сайтов связывания включают вариабельный домен антитела, лигандсвязывающий сайт рецептора или связывающий рецептор сайт лиганда. В некоторых аспектах связывающие полипептиды согласно изобретению включают множество (например, два, три, четыре или более) сайтов связывания.

При применении в настоящем документе термин "природный остаток" должен относиться к аминокислотному остатку, который встречается в природе в определенном положении аминокислоты связывающего полипептида (например, антитела или его фрагмента) и который не модифицирован, введен или изменен рукой человека.

При применении в настоящем документе термин "измененный связывающий полипептид" или "модифицированный связывающий полипептид" включает связывающие полипептиды (например, антитело или его фрагмент), включающие по меньшей мере один неприродный мутантный аминокислотный остаток.

Термин "специфически связывающий", используемый в настоящем документе, относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с антигеном с константой диссоциации ( $K_d$ ) не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-11}$ ,  $1 \times 10^{-12}$  М или менее и/или связываться с антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше его сродства к неспецифическому антигену.

При применении в настоящем документе термин "антитело" относится к таким структурам (например, интактным молекулам антител, фрагментам антител или их вариантам), которые имеют значительную известную специфическую иммунореактивную активность в отношении представляющего интерес антигена (например, антигена, ассоциированного с опухолью). Антитела и иммуноглобулины включают легкие и тяжелые цепи, с межцепочечной ковалентной связью между ними или без нее. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены.

Как будет обсуждаться более подробно ниже, общий термин "антитело" включает пять различных классов антител, которые могут отличаться биохимически. Все пять классов антител, очевидно, включаются в объем текущего описания, последующее обсуждение, как правило, будет направлено на класс IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается иммуноглобулинов IgG, они включают две идентичные легкие цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Да и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000 Да. Четыре цепи связаны дисульфидными связями в конфигурации "Y", где легкие цепи окаймляют тяжелые цепи, начиная с устья "Y" и продолжая вдоль вариабельной области.

Легкие цепи иммуноглобулина классифицируются как либо каппа, либо лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан либо с легкой цепью каппа, либо с легкой цепью лямбда. В общем легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, а части "хвоста" двух тяжелых цепей связаны друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, когда иммуноглобулины создаются либо с помощью гибридом, В-клеток, либо с помощью генетически сконструированных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности начинаются с N-конца в сторону вилкообразных концов конфигурации Y к C-концу от основания каждой цепи. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма-, му-, альфа-, дельта- или эпсилон- ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) с некоторыми подклассами между ними (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Природа именно этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA IgG или IgE соответственно. Подклассы изотипов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д.) хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию.

Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов легко различаются специализацией в данной области с учетом данного описания и соответственно входят в объем текущего раскрытия.

Обе легкие и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термин "область" относится к части или порции цепи иммуноглобулина или антитела и включает константную область или вариабельные области, а также более дискретные части или части указанных областей. Например, вариабельные области легкой цепи включают "области, определяющие комплементарность"

или "CDR", распределенные среди "каркасных областей" или "FR", как определено в настоящем документе.

Области тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина могут быть определены как "константная" область (C) или "вариабельная" область (V) на основе относительного отсутствия вариаций последовательности в областях у членов различных классов в случае "константной области" или значительной вариации в областях у членов различных классов в случае "вариабельных областей". Термины "константная область" и "вариабельная область" могут быть также использованы функционально. В связи с этим следует понимать, что вариабельные области иммуноглобулина или антитела определяют узнавание антигена и специфичность. С другой стороны, константные области иммуноглобулина или антитела придают важные эффекторные функции, такие как секреция, проницаемость через плаценту, связывание рецептора Fc, связывание комплемента и т.п. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Константные и вариабельные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов укладываются в виде доменов. Термин "домен" относится к глобулярной области тяжелой или легкой цепи, включающей пептидные петли (например, включающей от 3 до 4 пептидных петель), стабилизированные, например,  $\beta$ -складчатой конформацией и/или внутрцепочечной дисульфидной связью. Домены константной области легкой цепи иммуноглобулина обозначаются взаимозаменяемо как "домены константной области легкой цепи", "области CL" или "домены CL". Константные домены тяжелой цепи (например, шарнир, домены CH1, CH2 или CH3) обозначаются взаимозаменяемо как "константные домены области тяжелой цепи", домены области "CH" или "домены CH". Вариабельные домены легкой цепи обозначаются взаимозаменяемо как "вариабельные домены области легкой цепи", "домены VL области" или "домены VL". Вариабельные домены тяжелой цепи обозначаются взаимозаменяемо как "вариабельные домены области тяжелой цепи", "домены VH области" или "домены VH".

Традиционно нумерация вариабельных доменов константной области возрастает по мере того, как они располагаются дистальнее антигенсвязывающего сайта или аминоконца иммуноглобулина или антитела. N-конец каждой тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина представляет собой вариабельную область, и C-конец представляет собой константную область; домены CH3 и CL в действительности включают карбоксильный конец тяжелой и легкой цепей соответственно. Соответственно, домены легкой цепи иммуноглобулина организованы в ориентации VL-CL, в то время как домены тяжелой цепи организованы в ориентации VH-CH1-шарнир-CH2-CH3.

Положения аминокислот в константной области тяжелой цепи, включая положения аминокислот в CH1, шарнире, CH2, CH3, и в домене CL могут быть пронумерованы в соответствии с системой нумерации по индексу Kabata (см. Rabat et al., в "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5<sup>th</sup> edition, 1991). Альтернативно, положения аминокислот антитела могут быть пронумерованы в соответствии с системой нумерации по индексу EU (см. Rabat et al., там же).

При применении в настоящем документе термин "домен VH" включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и термин "домен VL" включает аминоконцевой вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина.

При применении в настоящем документе термин "домен CH1" включает первый (самый аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, который простирается, например, приблизительно от положений 114-223 в системе нумерации Kabata (от положений 118-215 по EU). Домен CH1 примыкает к домену VH и аминоконцу шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина и не образует части области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина.

При применении в настоящем документе термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Это шарнирная область включает приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям изменять положение независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три различных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161: 4083).

При применении в настоящем документе термин "домен CH2" включает часть тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, которая тянется, например, приблизительно от положений 244-360 в системе нумерации по Кабату (положения 231-340 по EU). Домен CH2 является уникальным в том смысле, что он не тесно спарен с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи размещены между двумя доменами CH2 интактной природной молекулы IgG. В одном варианте осуществления связывающий полипептид по текущему раскрытию включает домен CH2, происходящий от молекулы IgG1 (например, молекулы IgG1 человека).

При применении в настоящем документе термин "домен CH3" включает часть тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, которая тянется приблизительно на 110 остатков от N-конца домена CH2, например, приблизительно от положений 361-476 в системе нумерации по Кабату (положения 341-445 по EU). Домен CH3, как правило, образует C-концевую часть антитела. В некоторых иммуноглобулинах, однако, дополнительные домены могут располагаться за областью CH3 с образованием C-концевой части молекулы (например, домен CH4 в  $\mu$ -цепи IgM и  $\epsilon$ -цепи IgE). В одном варианте осуществления связы-

вающий полипептид по текущему раскрытию включает домен CH3, происходящий от молекулы IgG1 (например, молекулы IgG1 человека).

При применении в настоящем документе термин "домен CL" включает домен константной области легкой цепи иммуноглобулина, который расположен, например, приблизительно в положении 107A-216 по Кабату. Домен CL примыкает к домену VL. В одном варианте осуществления связывающий полипептид по текущему раскрытию включает домен CL, происходящий от легкой каппа-цепи (например, легкой каппа-цепи человека).

При применении в настоящем документе термин "область Fc" определяется как часть константной области тяжелой цепи, начинающаяся в шарнирной области непосредственно перед сайтом расщепления папаином (т.е. остатком 216 в IgG, причем первый остаток константной области тяжелой цепи будет в положении 114) и заканчивающаяся на С-конце антитела. Соответственно, полная область Fc включает по меньшей мере шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

Термин "нативный Fc", используемый в настоящем документе, относится к молекуле, включающей последовательность фрагмента, не связывающего антиген, возникающей в результате гидролиза антитела или полученной с помощью других способов, как в мономерной, так и в мультимерной форме, и она может включать шарнирную область. Исходный источник иммуноглобулина для нативного Fc предпочтительно представляет собой иммуноглобулин человеческого происхождения и может быть любым иммуноглобулином, хотя предпочтительны IgG1 и IgG2. Нативные молекулы Fc построены из мономерных полипептидов, которые могут быть соединены в димерные или мультимерные формы с помощью ковалентных (т.е. дисульфидных связей) и нековалентных связей. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул Fc находится в диапазоне от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Одним из примеров нативного Fc является связанный дисульфидным мостиком димер, возникающий в результате расщепления папаином IgG. Термин "нативный Fc", используемый в настоящем документе, является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

Термин "вариант Fc", используемый в настоящем документе, относится к молекуле или последовательности, которая модифицирована относительно нативного Fc, но все еще включает сайт связывания для рецептора реутилизации, FcRn (неонатального рецептора Fc). Иллюстративные варианты Fc, а также их взаимодействие с рецептором реутилизации известны в данной области техники. Таким образом, термин "вариант Fc" может включать молекулу или последовательность, которая гуманизирована относительно нативного Fc, происходящего не от человека. Кроме того, нативный Fc включает области, которые могут быть удалены, поскольку они обеспечивают структурными особенностями или биологической активностью, которые не требуются для антителоподобных связывающих полипептидов по изобретению. Таким образом, термин "вариант Fc" включает молекулу или последовательность, в которой отсутствует один или более из нативных сайтов или остатков Fc или в которой модифицированы один или более сайтов или остатков Fc, влияющих или вовлеченных в (1) образование дисульфидных связей, (2) несовместимость с выбранной клеткой-хозяином, (3) N-концевую гетерогенность при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с комплементом, (6) связывание с рецептором Fc, кроме рецептора реутилизации, или (7) в зависимую от антител клеточную цитотоксичность (ADCC).

Термин "домен Fc", используемый в настоящем документе, охватывает нативные Fc и варианты и последовательности Fc, как определено выше. Как в вариантах Fc, так и в нативных молекулах Fc термин "домен Fc" включает молекулы в мономерной или мультимерной форме, будь то молекулы, полученные в результате гидролиза целого антитела или полученные с помощью других способов.

Как указано выше, переменные области антитела позволяют ему избирательно узнавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. Это значит, что домен VL и домен VH антитела объединяются с образованием переменной области (Fv), которая определяет трехмерный сайт связывания антигена. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя гиперпеременными областями (CDR) на каждой из переменных областей тяжелой и легкой цепей. При применении в настоящем документе термин "антигенсвязывающий сайт" включает сайт, который специфически связывается (иммунно взаимодействует) с антигеном (например, антигеном клеточной поверхности или растворимым антигеном). Антигенсвязывающий сайт включает переменную область тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, и сайт связывания, образованный этими переменными областями, определяет специфичность антитела. Антигенсвязывающий сайт образуется переменными областями, которые варьируются от одного антитела к другому. Модифицированные антитела по текущему раскрытию включают по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт.

В определенных вариантах осуществления связывающие полипептиды по текущему раскрытию включают по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, которые обеспечивают связывание связывающего полипептида с выбранным антигеном.

Антигенсвязывающие домены не должны происходить из одной и той же молекулы иммуноглобулина. В связи с этим переменная область может происходить или происходит от любого вида животного-

го, если может быть индуцирован рост гуморального ответа и выработка иммуноглобулинов против желаемого антигена. В таком случае варибельная область связывающего полипептида может происходить, например, от млекопитающих, например, может происходить от человека, мыши, крысы, козы, овцы, примата, не являющегося человеком (например, яванских макак, обыкновенных макак и т.д.), волчьих или верблюжьих (например, от верблюдов, лам и родственных видов).

В природных антителах шесть CDR, присутствующих на каждом мономерном антителе, представляют собой короткие, несмежные аминокислотные последовательности, которые расположены специфически для формирования антигенсвязывающего сайта, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Оставшиеся варибельные домены тяжелых и легких цепей проявляют меньшую межмолекулярную варибельность аминокислотной последовательности и называются каркасными областями. Каркасные области в значительной степени принимают  $\beta$ -складчатую конформацию, и CDR образуют петли, которые соединяют  $\beta$ -складчатую структуру и в некоторых случаях образуют ее часть. Таким образом, эти каркасные области служат для формирования каркаса, который обеспечивает расположение шести CDR в правильной ориентации с помощью межцепочечных, нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный правильно расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с иммунореактивным эпитопом антигена.

Примеры связывающих полипептидов по изобретению включают варианты антител. При применении в настоящем документе термин "вариант антитела" включает синтетические и сконструированные формы антител, которые изменены таким образом, что они не встречаются в природе, например формы антител, которые включают по меньшей мере две части тяжелых цепей, но не две полные тяжелые цепи (такие как антитела с делецией домена или мини-тела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные для связывания с двумя или более различными антигенами или с различными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелых цепей, соединенные с молекулами scFv; и т.п. Кроме того, термин "вариант антитела" включает мультивалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д. антитела), которые связываются с тремя, четырьмя или более копиями одного и того же антигена.

Используемый в данном описании термин "валентность" относится к числу потенциальных связывающих мишень сайтов в полипептиде. Каждый связывающий мишень сайт специфически связывает одну молекулу-мишень или специфический сайт на молекуле-мишени. Когда полипептид включает более одного связывающего мишень сайта, каждый связывающий мишень сайт может специфически связываться с одинаковыми или различными молекулами (например, может связываться с различными лигандами или с различными антигенами или с различными эпитопами на одном и том же антигене). Рассматриваемые связывающие полипептиды предпочтительно имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфический для молекулы антигена человека.

Термин "специфичность" относится к способности специфически связывать (например, иммуно взаимодействовать с) данный антиген-мишень (например, антигеном-мишенью человека). Связывающий полипептид может быть моноспецифическим и включает один или более сайтов связывания, которые специфически связывают мишень, или полипептид может быть мультиспецифическим и включает два или более сайта связывания, которые специфически связывают одни и те же или разные мишени. В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид по изобретению является специфическим для двух различных (например, неперекрывающихся) участков одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид по изобретению является специфическим более чем для одной мишени. Примеры связывающих полипептидов (например, антител), включающих антигенсвязывающие сайты, которые связываются с антигенами, экспрессируемыми на опухолевых клетках, известны в данной области техники, и один или более CDR от таких антител могут быть включены в антитело согласно изобретению.

Термин "линкерная часть" включает части, которые способны соединять эффекторную часть со связывающими полипептидами, раскрытыми в данном документе. Линкерная часть может быть выбрана таким образом, чтобы она была расщепляемой (например, ферментативно расщепляемой или чувствительной к pH) или нерасщепляемой. Примеры линкерных частей представлены в настоящем документе в табл. 2.

При применении в настоящем документе термин "эффекторная часть" включает диагностические и терапевтические агенты (например, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, части лекарства и их фрагменты) с биологической или другой функциональной активностью. Например, модифицированный связывающий полипептид, включающий эффекторную часть, конъюгированную со связывающим полипептидом, имеет по меньшей мере одну дополнительную функцию или свойство по сравнению с неконъюгированным антителом. Например, конъюгация цитотоксического лекарства (например, эффекторной части) со связывающим полипептидом приводит к образованию связывающего полипептида с лекарственной цитотоксичностью в качестве второй функции (то есть, в дополнение к связыванию антигена). В другом примере конъюгация второго связывающего полипептида со связывающим полипепти-

дом может придать дополнительные связывающие свойства. В некоторых вариантах осуществления, когда эффекторная часть представляет собой кодируемый генетически терапевтический или диагностический белок или нуклеиновую кислоту, эффекторная часть может быть синтезирована или экспрессирована либо с помощью пептидного синтеза, либо путем методов рекомбинантных ДНК, которые хорошо известны в данной области техники. В другом аспекте, когда эффекторная часть не является генетически кодируемым пептидом или частью лекарства, эффекторная часть может быть синтезирована искусственно или очищена из природного источника. При применении в настоящем документе термин "часть лекарства" включает противовоспалительные, противоопухолевые, антиинфекционные (например, противогрибковые, антибактериальные, противопаразитарные, противовирусные и т.д.) и анестезирующие терапевтические агенты. В другом варианте осуществления часть лекарства представляет собой противораковый или цитотоксический агент. Совместимые части лекарства могут также включать пролекарства. Примеры эффекторных частей представлены в данном документе в табл. 1.

При применении в настоящем документе, термин "пролекарство" относится к предшественнику или производной форме фармацевтически активного агента, которые являются менее активными, реакционноспособными или склонными к побочным эффектам по сравнению с родительским лекарством, и способны ферментативно активироваться или иным образом превращаться в более активную форму *in vivo*. Пролекарства, совместимые с композициями по текущему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, включающие фосфат пролекарства, пролекарства, включающие аминокислоты, включающие тиофосфат пролекарства, включающие сульфат пролекарства, включающие пептид пролекарства, включающие  $\beta$ -лактамы пролекарства, пролекарства, включающие необязательно замещенный феноксиацетамид, или пролекарства, включающие необязательно замещенный фенилацетамид, 5-фторцитозин и другие пролекарства с 5-фторуридином, которые могут быть превращены в более активное цитотоксическое свободное лекарство. Специалист в данной области техники может создать химические модификации в желаемой части лекарства или его пролекарства для того, чтобы сделать реакции этого соединения более удобными относительно получения модифицированных связывающих полипептидов по текущему раскрытию. Части лекарства включают также производные соединения, фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры, амиды и простые эфиры частей лекарства, описанные в данном документе. Производные соединения включают модификации лекарств, идентифицированных в настоящем документе, которые могут улучшить или не существенно снизить желаемую терапевтическую активность конкретного лекарства.

При применении в настоящем документе, термин "противораковый агент" включает агенты, которые являются вредными для роста и/или пролиферации опухолевых или раковых клеток и могут действовать для уменьшения, ингибирования или уничтожения злокачественного роста. Примеры таких агентов включают, но не ограничиваются этим, цитостатики, алкилирующие агенты, антибиотики, цитотоксические нуклеозиды, связывающие тубулин агенты, гормоны, антагонисты гормонов, цитотоксические агенты и тому подобное. Цитотоксические агенты включают томасмицин, производные майтансина, производные криптофицина, производные антрациклина, производные бис-фосфонатов, производные лептомицина, производные стрептонирина, производные ауристатина и производные дуокармицина. Любой агент, который действует для задержки или замедления роста иммунореактивных клеток или злокачественных клеток, входит в объем текущего раскрытия.

Термин "антиген" или "антиген-мишень", используемый в настоящем документе, относится к молекуле или к части молекулы, которая способна связываться со связывающим сайтом связывающего полипептида. Антиген-мишень может иметь один или несколько эпитопов.

## II. Связывающие полипептиды

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются связывающие полипептиды (например, антитела, фрагменты антител, варианты антител и гибридные белки), включающие домен Fc, где домен Fc включает остаток аспарагина в положении аминокислоты 298 в соответствии с нумерацией EU и остаток серина или треонина в положении аминокислоты 300 в соответствии с нумерацией EU.

В связывающих полипептидах, раскрытых в данном документе, могут быть использованы домены Fc любого класса иммуноглобулинов (например, IgM, IgG, IgD, IgA и IgE) и любых видов. Также могут быть использованы химерные домены Fc, включающие фрагменты доменов Fc от различных видов или классов Ig. В определенных вариантах осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG1 человека. В случае домена Fc IgG1 человека мутации аминокислоты дикого типа в положении 298 по Кабату с заменой на аспарагин и в положении 300 по Кабату с заменой на серин или треонин приводят к образованию консенсусного сайта N-связанного гликозилирования (т.е. сиквона N-X-T/S, где X обозначает любую аминокислоту, кроме пролина). Однако в случае доменов Fc других видов и/или классов или изоформ Ig специалист в данной области должен понимать, что для воссоздания сиквона N-X-T/S может возникнуть необходимость мутации домена Fc в положении 299 по Кабату, если присутствует остаток пролина.

Связывающие полипептиды, раскрытые в настоящем документе, охватывают любой связывающий полипептид, который включает домен Fc, имеющий N-связанный сайт гликозилирования в положении 298 в соответствии с нумерацией по Кабату. В некоторых вариантах осуществления связывающий поли-

пептид представляет собой антитело, или его фрагмент, или его производное. Любое антитело из любого источника или вида может быть использовано в связывающих полипептидах, раскрытых в данном документе. Подходящие антитела включают без ограничения антитела человека, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид по текущему раскрытию может включать антигенсвязывающий фрагмент антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого он произошел) за связывание антигена (т.е. за специфическое связывание). Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью рекомбинантных или биохимических методов, которые хорошо известны в данной области техники. Иллюстративные антигенсвязывающие фрагменты включают Fv, Fab, Fab' и (Fab')<sub>2</sub>. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой измененный антигенсвязывающий фрагмент, включающий по меньшей мере один сконструированный сайт гликозилирования. В одном иллюстративном варианте осуществления измененный антигенсвязывающий фрагмент по текущему раскрытию включает измененный домен VH, описанный выше. В другом иллюстративном варианте осуществления измененный антигенсвязывающий фрагмент по текущему раскрытию включает измененный домен CH1, описанный выше.

В иллюстративных вариантах осуществления связывающий полипептид включает одноцепочечную последовательность вариабельной области (ScFv). Одноцепочечные последовательности вариабельной области включают одиночный полипептид, имеющий один или более сайтов связывания антигена, например домен VL, связанный посредством гибкого линкера с доменом VH. Молекулы ScFv могут быть сконструированы в ориентации VH-линкер-VL или в ориентации VL-линкер-VH. Гибкий шарнир, который связывает домены VL и VH, составляющие антигенсвязывающий сайт, предпочтительно включает от приблизительно 10 до приблизительно 50 аминокислотных остатков. Соединяющие пептиды известны в данной области техники. Связывающий полипептид по изобретению может включать по меньшей мере одну ScFv и/или по меньшей мере одну константную область. В одном варианте осуществления связывающий полипептид по настоящему изобретению может включать по меньшей мере одну ScFv, связанную или соединенную с антителом или фрагментом, включающим домен CH1 (например, домен CH1, включающий остаток аспарагина в положении 114 по Кабату) и/или домен CH2 (например, домен CH2, включающий остаток аспарагина в положении 298 по EU, и серин или треонин в положении 300 по EU).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления связывающий полипептид по настоящему изобретению является поливалентным (например, четырехвалентным) антителом, которое получают посредством соединения последовательности ДНК, кодирующей антитело, с молекулой ScFv (например, измененной молекулой ScFv). Например, в одном варианте осуществления эти последовательности объединяют таким образом, что молекулу ScFv (например, измененную молекулу ScFv) соединяют на ее N-конце или C-конце с фрагментом Fc антитела через гибкий линкер (например, линкер Gly/Ser). В другом варианте осуществления четырехвалентное антитело по настоящему изобретению может быть получено путем соединения молекулы ScFv с соединяющим пептидом, который соединен с доменом CH1 (например, с доменом CH1, включающим остаток аспарагина в положении 114 по Кабату), для конструирования четырехвалентной молекулы ScFv-Fab.

В другом варианте осуществления связывающий полипептид по настоящему изобретению представляет собой измененное мини-тело. Измененные мини-тела по текущему раскрытию представляют собой димерные молекулы, полученные из двух полипептидных цепей, причем каждая из которых включает молекулу ScFv (например, измененную молекулу ScFv, включающую измененный домен VH, описанный выше), которые соединены с доменом CH3 или его частью через соединяющий пептид. Мини-тела могут быть получены путем конструирования компонента ScFv и компонента соединяющий пептид-CH3 с помощью методов, описанных в данной области техники (см., например, патент США № 5837821 или WO 94/09817A1). В другом варианте осуществления может быть сконструировано четырехвалентное мини-тело. Четырехвалентные мини-тела могут быть сконструированы таким же образом, как мини-тела, за исключением того, что две молекулы ScFv соединяют с помощью гибкого линкера. Связанный конструктор scFv-scFv затем соединяют с доменом CH3.

В другом варианте осуществления связывающий полипептид по текущему раскрытию включает диатело. Диатела представляют собой димерные, четырехвалентные молекулы, каждая из которых включает полипептид, сходный с молекулами scFv, но обычно имеет короткие линкеры из (менее 10, а предпочтительно 1-5) аминокислотных остатков, соединяющие оба вариабельных домена так, что домены VL и VH на одной и той же полипептидной цепи не могут взаимодействовать. Вместо этого, домен VL и VH одной полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH и VL (соответственно) на второй полипептидной цепи (см., например, WO 02/02781). Диатела по текущему раскрытию включают молекулу scFv, соединенную с доменом CH3.

В других вариантах осуществления связывающие полипептиды согласно изобретению включают мультиспецифические или поливалентные антитела, включающие один или более вариабельных доменов в ряду одной и той же полипептидной цепи, например, полипептиды с tandemными вариабельными до-

менами (TVD). Иллюстративные полипептиды TVD включают конфигурацию "двойной головки" или "двойного Fv", описанную в патенте США № 5989830. В конфигурации двойного Fv вариабельные домены двух различных антител экспрессируют в тандемной ориентации на двух отдельных цепях (одной тяжелой цепи и одной легкой цепи), где одна полипептидная цепь имеет в ряду два повторения VH, разделенных пептидным линкером (VH1-линкер-VH2), а другая полипептидная цепь состоит из комплементарных доменов VL, соединенных в ряду пептидным линкером (VL1-линкер-VL2). В конфигурации перекрестной двойной головки вариабельные домены двух различных антител экспрессируют в тандемной ориентации на двух отдельных полипептидных цепях (одной тяжелой цепи и одной легкой цепи), где одна полипептидная цепь имеет в ряду два VH, разделенных пептидным линкером (VH1-линкер-VH2), а другая полипептидная цепь состоит из комплементарных доменов VL, соединенных в ряду пептидным линкером в противоположной ориентации (VL2-линкер-VL1). Дополнительные варианты антител на основе формата "двойного Fv" включают биспецифическое антитело с двойным вариабельным доменом IgG (DVD-IgG) (см. патент США № 7612181 и формат TBTI (см. патент США 2010/0226923 A1). Добавление константных доменов к соответствующим цепям двойного Fv (CH1-Fc к тяжелой цепи и каппа или ламбда константного домена к легкой цепи) приводит к функциональным биспецифическим антителам без какой-либо необходимости в дополнительных модификациях (т.е. общеизвестное добавление константных доменов для повышения стабильности).

В другом иллюстративном варианте осуществления связывающий полипептид включает биспецифическое антитело с перекрестным двойным вариабельным доменом IgG (CODV-IgG) на основе конфигурации "двойной головки" (см. патент US 20120251541 A1, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме). Варианты антител CODV-IgG имеют одну полипептидную цепь с доменами VL, соединенными в ряду с доменом CL (VL1-L1-VL2-L2-CL) и вторую полипептидную цепь с комплементарными доменами VH, соединенными в ряду в противоположной ориентации с доменом CH1 (VH2-L3-VH1-L4-CH1), где полипептидные цепи образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь. В определенном варианте осуществления второй полипептид может быть дополнительно соединен с доменом Fc (VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). В некоторых вариантах осуществления линкер L3 по меньшей мере в два раза длиннее линкера L1 и/или линкер L4 по меньшей мере в два раза длиннее линкера L2. Например, L1 и L2 могут составлять 1-3 аминокислотных остатка в длину, L3 может составлять от 2 до 6 аминокислотных остатков в длину, и L4 может составлять от 4 до 7 аминокислотных остатков в длину. Примеры подходящих линкеров включают один остаток глицина (Gly); диглициновый пептид (Gly-Gly); трипептид (Gly-Gly-Gly); пептид с четырьмя остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с пятью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с шестью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с семью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с восемью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Могут быть использованы другие сочетания аминокислотных остатков, такие как пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser и пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser.

В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид включает молекулу иммуноадгезина, включающую связывающую область не от антитела (например, молекулу рецептора, лиганда или клеточной адгезии), соединенную с константной областью антитела (см., например, статью Ashkenazi et al., *Methods*, 1995 8(2), 104-115, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид включает иммуноглобулинподобные домены. Подходящие иммуноглобулинподобные домены включают без ограничения домены фибронектина (см., например, статью Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), DARPin (см., например, статью Stumpp et al. (2008), *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), домены Z белка A (см. статью Nygren et al. (2008), *FEBS J.* 275(11): 2668-76, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), липокалины (см., например, статью Skerra et al. (2008), *FEBS J.* 275(11): 2677-83, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), аффилины (см., например, статью Ebersbach et al. (2007), *J. Mol. Biol.* 372(1): 172-85, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), аффитины (см., например, статью Krehenbrink et al. (2008), *J. Mol. Biol.* 383(5): 1058-68, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), авимеры (см., например, статью Silverman et al. (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(12): 1556-61, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), финомеры (см., например, статью Grabulovski et al. (2007), *J. Biol. Chem.* 282(5): 3196-3204, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), и пептиды домена Kunitz (см., например, статью Nixon et al. (2006), *Curr Opin Drug Discov Devel.* 9(2): 261-8, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

### III. N-связанные гликаны

В определенных вариантах осуществления домен Fc связывающих полипептидов, описанных в данном документе, гликозилирован в положении 298 сконструированного аргинина (N298) в соответствии с нумерацией EU. N-связанный гликан обычно связан через  $\beta$ -гликозиламидную связь с группой азота боковой цепи N298. Однако могут быть использованы также другие подходящие известные в данной области техники связи.

Любой тип природного или синтетического (т.е. неприродного) N-связанного гликана может быть соединен с N114. Например, гликан может представлять собой природный гликан или сконструированный гликан, содержащий неприродные связи. В некоторых вариантах осуществления гликан включает сахарид, который может быть окисленным (например, путем обработки периодатом), с получением группы, подходящей для конъюгации с эффекторной частью молекулы (например, реактивной альдегидной группы). Подходящие окисляемые сахараиды включают без ограничения галактозу и сиаловую кислоту (например, N-ацетилнейраминовую кислоту). В некоторых вариантах осуществления гликан представляет собой 2-антенарный гликан. В некоторых вариантах осуществления гликан представляет собой природную гликоформу млекопитающих.

Гликозилирование может быть достигнуто с помощью любых способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления гликозилирование достигается путем экспрессии связывающих полипептидов в клетках, способных к N-связанному гликозилированию. Может быть использована любая природная или сконструированная клетка (например, прокариотическая или эукариотическая). В целом для осуществления гликозилирования используются клетки млекопитающих. N-гликаны, которые продуцируются в клетках млекопитающих, обычно называют сложными N-гликанами (см., например, книгу Drickamer K., Taylor ME (2006). *Introduction to Glycobiology*, 2<sup>nd</sup> ed., включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Эти сложные N-гликаны имеют структуру с внешними ветвями обычно в количестве от двух до шести с последовательностью сиалиллактозамина, связанной с внутренней структурой каркаса  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Сложный N-гликан имеет по меньшей мере одну ветвь и предпочтительно по меньшей мере две ветви из чередующихся остатков GlcNAc и галактозы (Gal), которые являются концевыми в олигосахаридах, такие как, например, NeuNAc-, NeuAc  $\alpha$ 2,6 GalNAc  $\alpha$ 1; NeuAc  $\alpha$ 2,3 Gal  $\beta$ 1, 3 GalNAc  $\alpha$ 1; и NeuAc  $\alpha$ 2,3/6 Gal $\beta$ 1,4 GlcNAc  $\beta$ 1. Кроме того, в галактозе могут существовать сульфатные эфиры, остатки GalNAc и GlcNAc, и сложные эфиры фосфорной кислоты могут существовать в остатках маннозы. NeuAc может быть O-ацетилированным или замененным на NeuGI (N-гликолилнейраминовую кислоту). Сложные N-гликаны могут также иметь внутрицепочечные замены разветвленного GlcNAc и фукозы каркаса (Fuc).

Дополнительно или альтернативно, гликозилирование может быть достигнуто или модифицировано с помощью ферментативных способов *in vitro*. Например, может быть использована одна или более гликозилтрансфераз для добавления определенных сахаридных остатков к N298, и одна или более глюкозидаз может быть использована для удаления нежелательных сахаридов из N-связанного гликана. Такие ферментативные способы хорошо известны в данной области техники (см., например, WO 2007/005786, который включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме).

### IV. Иммунологические эффекторные функции и модификации Fc

В некоторых вариантах осуществления связывающие полипептиды согласно изобретению могут включать константную область антитела (например, константную область IgG, например, константную область IgG человека, например, константную область IgG1 или IgG4 человека), которая опосредует одну или более эффекторных функций. Например, связывание компонента C1 комплемента с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация комплемента играет важную роль в опсонизации и лизисе клеточных патогенов. Активация комплемента также стимулирует воспалительную реакцию, а также может быть вовлечена в аутоиммунную гиперчувствительность. Кроме того, антитела связываются с рецепторами на различных клетках через область Fc, причем рецепторный сайт связывания Fc в области Fc антитела связывается с рецептором Fc (FcR) на клетке. Существует целый ряд рецепторов Fc, которые специфичны для различных классов антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпсилон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с рецепторами Fc на клеточной поверхности вызывает ряд важных и разнообразных биологических реакций, включая поглощение и разрушение частиц, покрытых антителами, клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней с помощью клеток-киллеров (так называемая зависящая от антител опосредуемая клетками цитотоксичность или ADCC), высвобождение медиаторов воспаления, плацентарный перенос и контроль продукции иммуноглобулинов. В предпочтительных вариантах осуществления связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению связываются с рецептором Fc-гамма. В альтернативных вариантах осуществления связывающие полипептиды согласно изобретению могут включать константную область, которая лишена одной или более эффекторных функций (например, активности ADCC) и/или не способна связывать рецептор Fc $\gamma$ .

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают антитела, в которых по меньшей мере одна аминокислота в одном или более доменах константной области удалена или иным образом изменена так, чтобы обеспечить желаемые биохимические характеристики, такие как сниженные или повышенные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, увеличенная способность к локализации в месте опухоли, сниженное время полужизни в сыворотке или повышенное время полужизни в сыворотке по сравнению с полным, неизменным антителом с приблизительно той же иммуногенностью. Например, некоторые антитела для применения в диагностических и терапевтических методах, описанных в настоящем документе, представляют собой антитела с удаленными доменами, которые включают полипептидную цепь, сходную с тяжелой цепью иммуноглобулина, но у которых отсутствует по меньшей мере часть одного или более доменов тяжелой цепи. Например, в некоторых антителах один полный домен константной области модифицированного антитела будет удален, например будет удален весь или часть домена CH2.

В некоторых других вариантах осуществления связывающие полипептиды включают константные области, происходящие от различных изотипов антител (например, константные области от двух или более из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека). В других вариантах осуществления связывающие полипептиды включают химерный шарнир (т.е. шарнир, включающий шарнирные части, происходящие от шарнирных доменов различных изотипов антител, например верхний шарнирный домен от молекулы IgG4 и средний шарнирный домен от IgG1). В одном варианте осуществления связывающие полипептиды включают область Fc или ее часть от молекулы IgG4 человека и мутацию Ser228Pro (по нумерации EU) в каркасе шарнирной области молекулы.

В некоторых вариантах осуществления часть Fc может быть мутирована для увеличения или уменьшения эффекторной функции с использованием способов, известных в данной области техники. Например, делеция или инактивация (с помощью точечных мутаций или других методов) домена константной области может уменьшить связывание рецептора Fc циркулирующего модифицированного антитела, тем самым увеличивая локализацию в опухоли. В других случаях может быть так, что модификации константной области, согласующиеся с настоящим изобретением, ослабляют связывание комплемента и тем самым уменьшают период полужизни в сыворотке и неспецифическое связывание конъюгированного цитотоксина. Еще одни модификации константной области могут быть использованы для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных частей, что позволяет усиливать локализацию благодаря увеличению антигенной специфичности или гибкости. Полученный физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация в опухоли, биораспределение и период полужизни в сыворотке, могут быть легко измерены и количественно оценены с использованием хорошо известных иммунологических методов без излишнего экспериментирования.

В некоторых вариантах осуществления домен Fc, применяемый в качестве антитела по изобретению, представляет собой вариант Fc. При применении в настоящем документе термин "вариант Fc" относится к области Fc, имеющей по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с доменом Fc дикого типа, производным которого является указанный домен Fc. Например, когда домен Fc происходит от антитела IgG1 человека, вариант Fc указанного домена Fc IgG1 человека включает по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с указанным доменом Fc.

Аминокислотная(ые) замена(ы) варианта Fc могут быть локализованы в любом положении (т.е. в любом положении аминокислоты по соглашению EU) в пределах домена Fc. В одном варианте осуществления вариант Fc включает замену в положении аминокислоты, локализованном в домене шарнира или его части. В другом варианте осуществления вариант Fc включает замену в положении аминокислоты, локализованном в домене CH2 или его части. В другом варианте осуществления вариант Fc включает замену в положении аминокислоты, локализованном в домене CH3 или его части. В другом варианте осуществления вариант Fc включает замену в положении аминокислоты, локализованном в домене CH4 или его части.

В связывающих полипептидах согласно изобретению может использоваться любой известный в данной области техники вариант Fc, который, как известно, создает улучшение (например, снижение или усиление) эффекторной функции и/или связывания с FcR. Указанные варианты Fc могут включать, например, любую из аминокислотных замен, раскрытых в международных публикациях PCT WO 88/07089A1, WO 96/14339 A1, WO 98/05787 A1, WO 98/23289 A1, WO 99/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 00/09560 A2, WO 00/32767 A1, WO 00/42072 A2, WO 02/44215 A2, WO 02/060919A2, WO 03/074569A2, WO 04/016750A2, WO 04/029207A2, WO 04/035752A2, WO 04/063351 A2, WO 04/074455 A2, WO 04/099249 A2, WO 05/040217 A2, WO 05/070963 A1, WO 05/077981 A2, WO 05/092925 A2, WO 05/123780 A2, WO 06/019447 A1, WO 06/047350 A2 и WO 06/085967 A2 или патентах США № 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253 и 7083784, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки. В одном иллюстративном варианте осуществления связывающий полипептид по изобретению может включать вариант Fc, включающий аминокислотную замену в положении 268 по EU (например, H268D или H268E). В другом иллюстративном варианте осуществле-

ния связывающий полипептид согласно изобретению может включать аминокислотную замену в положении 239 по EU (например, S239D и S239E) и/или в положении 332 по EU (например, I332D или I332Q).

В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид по изобретению может включать вариант Fc, включающий аминокислотную замену, которая изменяет независимые от антигена эффекторные функции антитела, в частности период полужизни связывающего полипептида в циркуляторном русле. Такие связывающие полипептиды характеризуются либо повышенным, либо пониженным связыванием с FcRn по сравнению со связывающими полипептидами с отсутствием этих замен, следовательно, имеют повышенный или пониженный период полужизни в сыворотке крови соответственно. Варианты Fc с улучшенным сродством к FcRn, как ожидается, имеют более длинные периоды полужизни в сыворотке, и такие молекулы имеют удачное применение в методах лечения млекопитающих, когда желателен длительный период полувыведения вводимого антитела, например, для лечения хронического заболевания или нарушения. В отличие от этого, варианты Fc с пониженной аффинностью связывания FcRn, как ожидается, имеют более короткие периоды полужизни, и такие молекулы могут быть также использованы, например, для введения млекопитающему, когда может быть выгодно укороченное время циркуляции, например, для диагностической визуализации *in vivo* или в ситуациях, когда исходное антитело имеет токсические побочные эффекты, когда оно присутствует в кровотоке в течение продолжительных периодов времени. Варианты Fc с пониженной аффинностью связывания FcRn также менее вероятно будут проходить через плаценту и, таким образом, могут быть также полезны для лечения заболеваний или нарушений у беременных женщин. Кроме того, другие варианты применения, при которых может быть желательна сниженная аффинность связывания FcRn, включают такие варианты применения, в которых желательна локализация в мозге, почке и/или печени. В одном иллюстративном варианте осуществления измененные связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению характеризуются пониженным транспортом из сосудов через эпителий почечных клубочков. В другом варианте осуществления измененные связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению характеризуются пониженным транспортом через гематоэнцефалический барьер (BBB) из мозга в сосудистую сеть. В одном варианте осуществления антитело с измененным связыванием FcRn включает домен Fc, имеющий одну или более аминокислотных замен в пределах "петли, связывающей FcRn", домена Fc. Петля, связывающая FcRn, состоит из аминокислотных остатков 280-299 (в соответствии с нумерацией EU). Примеры аминокислотных замен, которые изменяют FcRn-связывающую активность, раскрыты в публикации международной заявки PCT № WO 05/047327, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению включают домен Fc, имеющий одну или более из следующих замен: V284E, H285E, N286D, K290E и S304D (по нумерации EU). В других иллюстративных вариантах осуществления связывающие молекулы по изобретению включают домен Fc человека с двойной мутацией H433K/N434F (см., например, патент США № 8163881).

В других вариантах осуществления связывающие полипептиды для использования в диагностических и терапевтических методах, описанных в настоящем документе, имеют константную область, например константную область тяжелой цепи IgG1 или IgG4, которая изменена для уменьшения или устранения гликозилирования. Например, связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению могут также включать вариант Fc, включающий аминокислотную замену, которая изменяет гликозилирование Fc антитела. Например, указанный вариант Fc может иметь пониженное гликозилирование (например, N- или O-связанное гликозилирование). В иллюстративных вариантах осуществления вариант Fc включает пониженное гликозилирование N-связанного гликана, обычно обнаруживаемого в положении аминокислоты 297 (по нумерации EU). В другом варианте осуществления антитело имеет аминокислотную замену вблизи или в пределах мотива гликозилирования, например мотива N-связанного гликозилирования, который включает аминокислотную последовательность NXT или NXS. В конкретном варианте осуществления антитело включает вариант Fc с аминокислотной заменой в положении аминокислоты 228 или 299 (по нумерации EU). В более конкретных вариантах осуществления антитело включает константную область IgG1 или IgG4, включающую мутацию S228P и T299A (по нумерации EU).

#### V. Эффекторные части

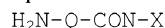
В некоторых вариантах осуществления связывающие полипептиды по текущему раскрытию включают эффекторные части. В целом эти эффекторные части конъюгированы (либо непосредственно, либо через линкер) с N-связанным гликаном на связывающем полипептиде (например, с N-связанным гликаном, связанным с N298 (по нумерации EU) домена CH2, и/или с N114 домена CH1 (при нумерации по Кабату)). В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид представляет собой полноразмерное антитело, включающее два домена CH1 с гликаном в положении 114 по Кабату, где оба гликана конъюгированы с одной или более эффекторными частями.

Любая эффекторная часть может быть добавлена к связывающим полипептидам, раскрытым в данном документе. Эффекторные части предпочтительно добавляют измененному антителу или его фрагменту неприродную функцию без существенного изменения свойственной активности связывающего

полипептида. Эффекторная часть может представлять собой, например, но не ограничиваясь этим, терапевтический или диагностический агент.

Модифицированный связывающий полипептид (например, антитело) по настоящему изобретению может включать одну или более эффекторных частей, которые могут быть одинаковыми или различаться.

В одном варианте осуществления эффекторная часть может иметь формулу (I)



Формула (I)

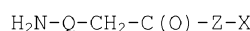
где A) Q представляет собой NH или O; и

B) CON является соединяющей частью; и

C) X представляет собой терапевтический агент, как определено в данном описании.

Соединяющая часть связывает терапевтический агент с  $\text{H}_2\text{N}-\text{Q}-$ . Соединяющая часть может включать по меньшей мере один из любых подходящих компонентов, известных специалистам в данной области техники, включая, например, алкиленильный компонент, полиэтиленгликольный компонент, поли(глицин)овый компонент, поли(оксазолин)овый компонент, карбонильный компонент, компонент, происходящий из цистеинамида, компонент, происходящий из валина, соединенного с цитрулином, и компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата, или любое их сочетание.

В другом варианте осуществления эффекторная часть формулы (I) может представлять собой формулу (Ia)



Формула (Ia)

в которой A) Q представляет собой NH или O и

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

где i) Cys представляет собой компонент, происходящий от цистеинамида;

ii) MC представляет собой компонент, происходящий от малеимида;

iii) VC представляет собой компонент, происходящий от цитрулина;

iv) PABC представляет собой компонент, происходящий от 4-аминобензилкарбамата;

v) X представляет собой терапевтический агент, как определено в настоящем описании;

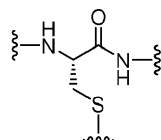
vi) a равно 0 или 1;

vii) b равно 0 или 1;

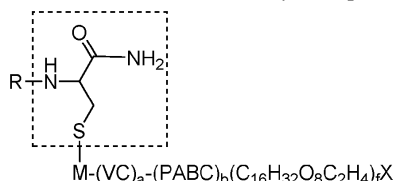
viii) c равно 0 или 1 и

ix) f равно 0 или 1.

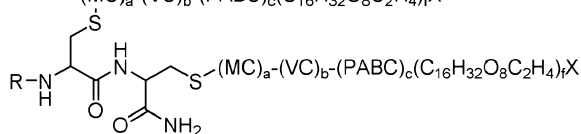
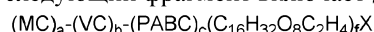
"Компонент, происходящий от цистеинамида" представляет собой точку присоединения к  $\text{H}_2\text{N}-\text{Q}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ . В одном варианте осуществления "компонент, происходящий от цистеинамида" может относиться к одной или более частям эффекторного фрагмента, имеющего структуру:



В одном варианте осуществления компонент "Cys" эффекторного фрагмента может включать одну такую часть. Например, следующая структура является демонстрацией эффекторного фрагмента с одной такой частью (где компонент "Cys" обозначается боксом с пунктирной линией):

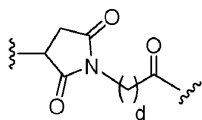


В другом варианте осуществления компонент "Cys" эффекторного фрагмента может включать две или более такие части. Например, следующий фрагмент включает две такие части:



Как можно видеть из структуры, каждый компонент "Cys" несет группу  $-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f\text{X}$ .

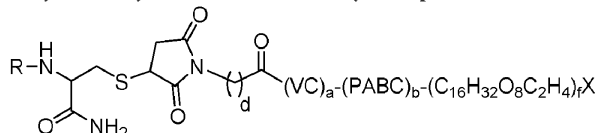
В одном варианте осуществления выражение "компонент, происходящий из малеимида" может относиться к любой части эффекторного фрагмента, имеющего структуру:



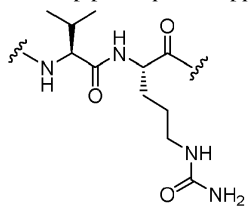
в которой  $d$  представляет собой целое число от 2 до 5.

Количество компонентов MC, включенных в любую группу Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-X в эффекторной части, указывается подстрочным индексом "a" и может составлять 0 или 1. В одном варианте осуществления  $a$  равно 1. В другом варианте осуществления  $b$  равно 0.

В одном варианте осуществления компонент "Cys" может быть соединен с компонентом "MC" через атом серы в компоненте "Cys", как указано в боксе с пунктирной линией в следующей структуре:

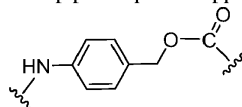


В одном варианте осуществления выражение "компонент, происходящий из валина в сочетании с цитрулином" может относиться к любой части эффекторного фрагмента со следующей структурой:



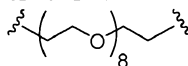
Количество компонентов VC, включенных в любую группу Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-X в эффекторной части, указывается подстрочным индексом "b" и может составлять 0 или 1. В одном варианте осуществления  $b$  равно 1. В другом варианте осуществления  $b$  равно 0.

В одном варианте осуществления выражение "компонент, происходящий из 4-аминобензил-карбамата" может относиться к любой части эффекторного фрагмента со следующей структурой:



Количество компонентов PABC, включенных в любую группу Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-X в эффекторной части, указывается подстрочным индексом "c" и может составлять 0 или 1. В одном варианте осуществления  $c$  равно 1. В другом варианте осуществления  $c$  равно 0.

В одном варианте осуществления "C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>" относится к следующей структуре:



Количество единиц C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>, включенных в любую группу Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-X в эффекторной части молекулы, указывается подстрочным индексом "f". В одном варианте осуществления  $f$  равно 1. В другом варианте осуществления  $f$  равно 0.

В одном варианте осуществления  $a$  равно 1,  $b$  равно 1,  $c$  равно 1 и  $f$  равно 0.

(a) Терапевтические эффекторные части.

В некоторых вариантах осуществления связывающие полипептиды по текущему раскрытию конъюгированы с эффекторной частью, включающей терапевтический агент, например, часть лекарства (или пролекарства) или радиоактивного соединения. В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой цитотоксин. Примеры цитотоксических эффекторных частей представлены в данном документе в табл. 1.

Таблица 1

## Примеры цитотоксических эффекторных частей

</	

фосфамид, цис-диаминплатину(II), дихлорид (цисплатин), мелфалан, митоксантрон и оксалиплатин), и ДНК-РНК-регуляторы транскрипции (например, актиномицин D, даунорубин, доксорубин, гомогаррингтонин и идарубин). Другие примеры цитостатических агентов, которые совместимы с настоящим изобретением, включают анзамицинбензохиноны, хиноидные производные (например, хинолоны, генистеин, бактациклин), бусульфан, ифосфамид, мехлорэтамин, триазихион, диазихион, карбазилхион, индолохион ЕО9, диазиридинилбензохион метил DZQ, триэтиленфосфорамид и соединения нитрозомочевины (например, кармустин, ломустин, семустин).

Примеры цитотоксических нуклеозидных противораковых агентов включают, например, аденозинарабинозид, цитарабин, цитозинарабинозид, 5-фторурацил, флударабин, флоксурин, фторафур и 6-меркаптопурин. Примеры связывающих тубулин противораковых агентов включают таксоиды (например, паклитаксел, доцетаксел, таксан), нокодазол, ризоксин, доластатины (например, доластатин-10, -11 или -15), колхицин и колхициноиды (например, ZD6126), комбретастатины (например, комбретастатин А-4, AVE-6032), и алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин (навелбин)). Примеры противораковых гормонов и антагонистов гормонов включают кортикостероиды (например, преднизон), прогестины (например, гидроксипрогестерон или медропрогестерон), эстрогены (например, диэтилstilбэстрол), антиэстрогены (например, тамоксифен), андрогены (например, тестостерон), ингибиторы ароматазы (например, аминоглютетимид), 17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин, 4-амино-1,8-нафталимид, апигенин, брэфелдин А, циметидин, дихлорметиленидифосфоновую кислоту, лейпролид (лейпрорелин), релизинг-гормон лютеинизирующего гормона, пифитрин-А, рапамицин, сексстероидсвязывающий глобулин и тапсигаргин. Примеры противораковых, антиангиогенных соединений включают ангиостатин K1-3, DL-а-орнитин-диформетил-орнитин, эндостатин, фумагиллин, генистеин, миноциклин, стауроспорин и (±)-талидомид.

Примеры противораковых ингибиторов ферментов включают, но не ограничиваются этим, S(+)-камптотecin, куркумин, (-)-дегуелин 5,6-дихлорбензимидазол-1-β-D-рибофуранозид, этопозид, форместан, фостриecin, гиспидин, 2-имино-1-имидазолидинуксусную кислоту (циклокреатин), мевинолин, трихостатин А, тирфостин AG 34 и тирфостин AG 879.

Примеры противораковых регуляторов генов включают 5-аза-2'-дезокситидин, 5-азацидин, холекальциферол (витамин D3), 4-гидрокситамоксифен, мелатонин, мифепристон, ралоксифен, транс-ретиноаль (альдегиды витамина А), ретиноевую кислоту, кислотное производное витамина А, 9-цис-ретиноевую кислоту, 13-цис-ретиноевую кислоту, ретинол (витамин А), тамоксифен и троглитазон.

Другие предпочтительные классы противораковых агентов включают, например, птеридиновое семейство лекарств, диинены и подофиллотоксины. Особенно пригодные члены этих классов включают, например, метоптерин, подофиллотоксин или производные подофиллотоксина, такие как этопозид или этопозид фосфат, лейросидин, виндезин, лейрозин и т.п.

Еще одни противораковые агенты, которые совместимы с указаниями настоящего описания, включают ауристатины (например, ауристин Е и монометилауристан Е), гелданамицин, калихеамицин, грамицидин D, майтансаноиды (например, майтансин), неокарциностантин, топотекан, таксаны, цитохалазин В, этидия бромид, эметин, тенопозид, колхицин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин и их аналоги или гомологи.

Еще одни противораковые агенты, которые совместимы с указаниями настоящего описания, включают производные томаимицина, производные майтансина, производные криптофицина, производные антрациклина, производные бисфосфонатов, производные лептомицина, производные стрептонирина, производные ауристатина и производные дуокармицина.

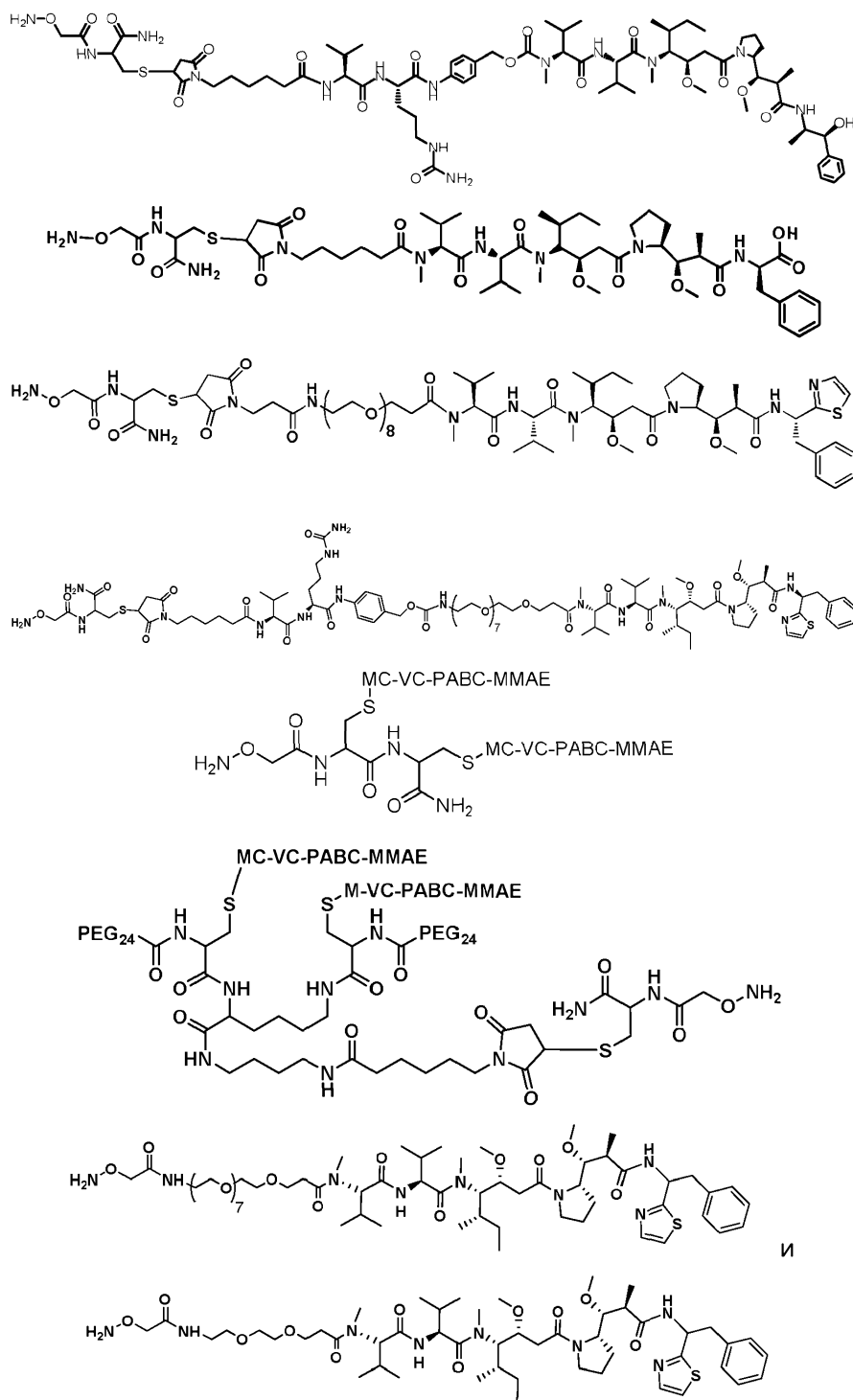
Другой класс совместимых противораковых агентов, которые могут быть использованы в качестве лекарственных частей, представляет собой радиосенсибилизирующие лекарства, которые могут быть эффективно направлены на опухолевые или иммунореактивные клетки. Такие лекарственные части повышают чувствительность к ионизирующей радиации, тем самым увеличивая эффективность лучевой терапии. Не ограничиваясь какой-либо теорией, антитела, модифицированные радиосенсибилизирующей лекарственной частью и интернализируемые опухолевой клеткой, будут осуществлять доставку радиосенсибилизатора ближе к ядру, где радиосенсибилизация будет максимальной. Антитела, которые теряют радиосенсибилизирующую часть, должны будут быстро выводиться из крови, локализуя оставшийся радиосенсибилизирующий агент в опухоли-мишени и обеспечивая минимальный захват в нормальных тканях. После клиренса из крови дополнительная лучевая терапия может быть осуществлена с помощью наружного пучка излучения, направленного конкретно к опухоли, радиоактивности, непосредственно имплантированной в опухоль, или с помощью системной радиоиммунотерапии тем же модифицированным антителом.

В одном варианте осуществления терапевтический агент включает радионуклиды или радиоактивные метки с высокой энергией ионизирующего излучения, способной вызывать множественные разрывы цепей в ядерной ДНК, что приводит к гибели клеток. Примеры радионуклидов с высокой энергией включают  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$  и  $^{188}\text{Re}$ . Эти изотопы, как пра-

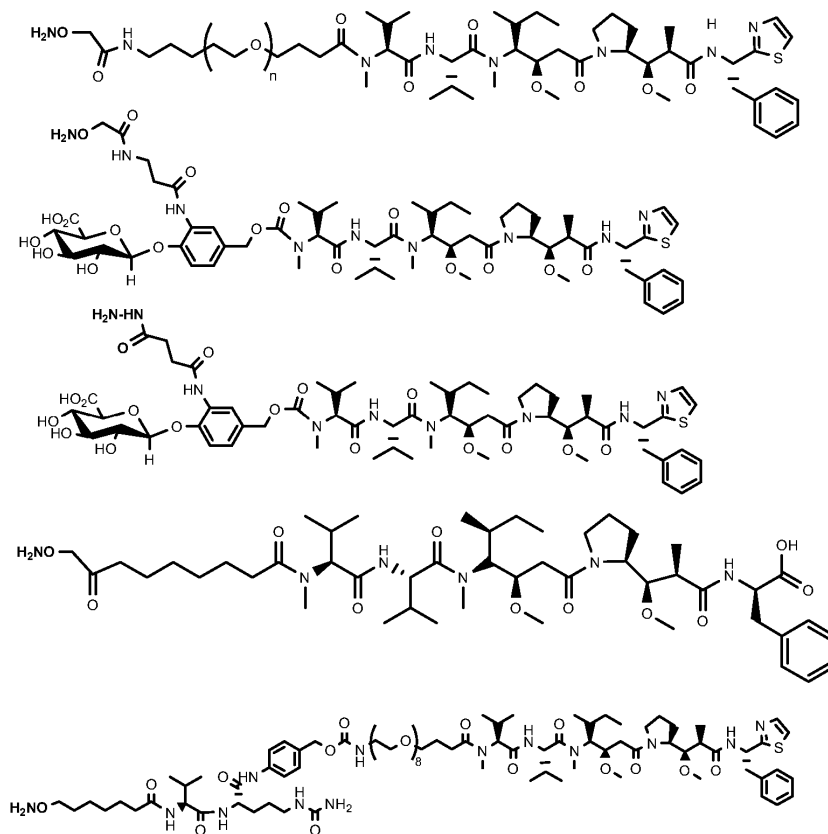
вило, дают  $\alpha$ - или  $\beta$ -частицы с высокой энергией, которые имеют короткую длину пути. Такие радионуклиды вызывают гибель клеток, в непосредственной близости к которым они находятся, например опухолевых клеток, к которым прикрепляется или в которые входит конъюгат. Они мало влияют или не влияют на неприкрепленные клетки и по существу не иммуногенны. Альтернативно, изотопы с высокой энергией могут быть созданы путем термического облучения в противном случае стабильного изотопа, например, как в случае бор-нейтрон-захватывающей терапии (Guan et al., PNAS, 95: 13206-10, 1998).

В одном варианте осуществления терапевтический агент выбран из MMAE, MMAF и PEG8-Do110.

Примеры терапевтических эффекторных частей включают структуры:



В одном варианте осуществления эффекторная часть выбрана из:



В определенных вариантах осуществления эффекторная часть содержит более одного терапевтического агента. Эти многочисленные терапевтические агенты могут быть одинаковыми или различными.

(b) Диагностические эффекторные части.

В некоторых вариантах осуществления связывающие полипептиды по текущему раскрытию конъюгированы с эффекторной частью, включающей диагностический агент. В одном варианте осуществления диагностический агент представляет собой поддающуюся определению небольшую молекулу, меченную, например, биотином, флуорофорами, хромофорами, зондами парамагнитного резонанса или радиоактивными метками. Примеры флуорофоров включают флуоресцентные красители (например, флуоресцеин, родамин и тому подобное) и другие люминесцентные молекулы (например, люминал). Флуорофор может быть чувствительным к окружающей среде так, что его флуоресценция изменяется, если он расположен в непосредственной близости к одному или более остаткам в модифицированном связывающем полипептиде, который подвергается структурным изменениям при связывании субстрата (например, зондов на основе дансильной группы). Примеры радиоактивных меток включают небольшие молекулы, содержащие атомы с одним или более ядер с низкой чувствительностью ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  и т.п.). Предпочтительно радионуклид представляет собой гамма-, фотон- или позитрон-излучающие радионуклиды с периодом полураспада, подходящим для обеспечения активности или обнаружения после времени, прошедшего между введением и локализацией в месте визуализации.

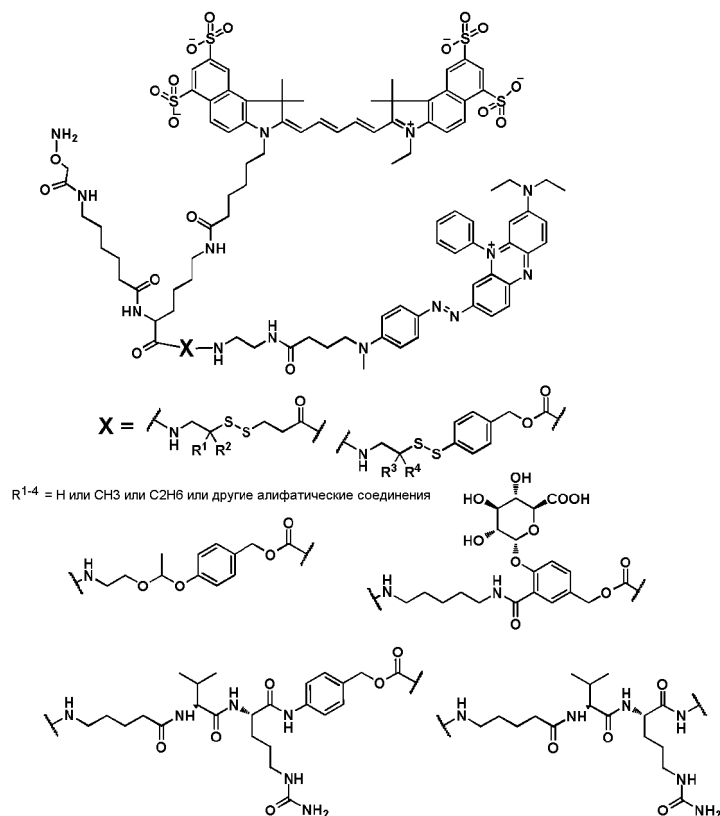
В одном варианте осуществления диагностический агент представляет собой полипептид. Примеры диагностических полипептидов включают ферменты с флуорогенной или хромогенной активностью, например способностью расщеплять субстрат, который образует в качестве продукта флуорофор или хромофор (т.е. репортерные белки, такие как люцифераза). Другие диагностические белки могут иметь внутреннюю флуорогенную или хромогенную активность (например, зеленые, красные и желтые флуоресцентные биолюминесцентные белки-экворины из светящихся морских организмов) или они могут включать белок, содержащий одно или несколько низкоэнергетических радиоактивных ядер ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  и т.п.).

Относительно использования радиоактивно меченых конъюгатов в сочетании с настоящим изобретением, связывающие полипептиды по настоящему изобретению могут быть помечены непосредственно (например, путем йодирования) или могут быть помечены непрямо путем использования хелатирующего агента. При применении в настоящем документе оба выражения "непрямое промечивание" и "непрямой подход к промечиванию" означают, что хелатирующий агент ковалентно присоединен к связывающему полипептиду и по меньшей мере один радионуклид связан с хелатирующим агентом. Такие хелатирующие агенты обычно называют бифункциональными хелатирующими агентами, так как они связывают

как полипептид, так и радиоизотоп. Примеры хелатирующих агентов включают производные 1-изотиоисматобензил-3-метилдиотеллентриаминпентауксусной кислоты ("MX-DTPA") и циклогексилдиэтилентриаминпентауксусной кислоты ("CHX-DTPA"). Другие хелатирующие агенты включают производные P-DOTA и EDTA. Особенно предпочтительные радионуклиды для непрямого промечивания включают  $^{111}\text{In}$  и  $^{90}\text{Y}$ . Большинство исследований по визуализации использует 5 мКи антитела, меченного  $^{111}\text{In}$ , поскольку эта доза является как безопасной, так и повышающей эффективность визуализации по сравнению с более низкими дозами с оптимальной визуализацией, происходящей через 3-6 шесть дней после введения антитела. См., например, Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328 and Carragullo et al., (1985), J. Nuc. Med. 26: 67. Особенно предпочтительным радионуклидом для прямого промечивания является  $^{131}\text{I}$ . Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что нерадиоактивные конъюгаты также могут быть созданы в зависимости от выбранного агента для конъюгации.

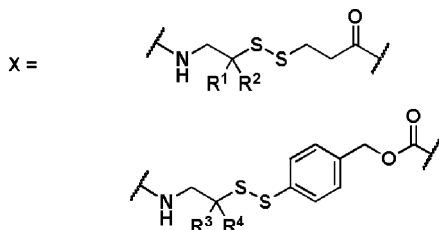
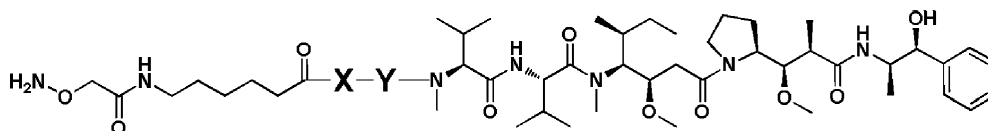
В некоторых вариантах осуществления диагностическая эффекторная часть представляет собой зонд FRET (резонансной передачи энергии флуоресценции). FRET использовали для различных диагностических целей, включая диагностику рака. Зонд FRET может включать расщепляемый линкер (линкер, чувствительный к ферменту или к pH), соединяющий донорскую и акцепторную части зонда FRET, где расщепление ведет к повышенной флуоресценции (включая ближнюю инфракрасную область) (см., например, A. Cobos-Correa et al. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63; S. Gehrig et al. Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012), Angew. Chem. Int. Ed., 51, 6258-6261).

В одном варианте осуществления эффекторную часть выбирают из:

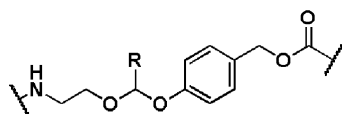


#### (с) Функционализированные эффекторные части.

В некоторых вариантах осуществления эффекторные части по изобретению могут быть функционализированными для включения дополнительных групп в дополнение к самой эффекторной части. Например, эффекторная часть может содержать расщепляемые линкеры, которые высвобождают эффекторную часть от связывающего полипептида при определенных условиях. В иллюстративных вариантах осуществления эффекторная часть может включать линкер, который расщепляется клеточными ферментами и/или который чувствителен к pH. Дополнительно или альтернативно, эффекторная часть может содержать дисульфидную связь, которая расщепляется внутриклеточным глутатионом при захвате клеткой. Примеры дисульфидных и чувствительных к pH линкеров приведены ниже:

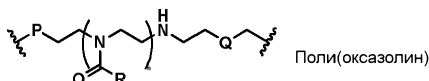
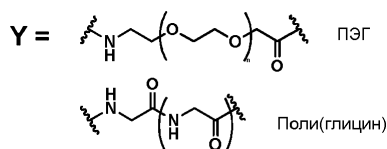
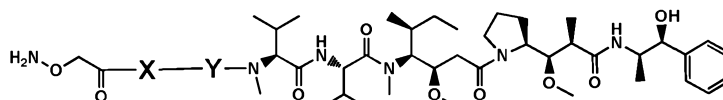


$R^{1-4} = H$  или  $CH_3$ , или  $C_2H_5$ , или другие алифатические соединения



$R = H$  или замещенные или незамещенные алкильные, алкиларильные группы

В еще одних вариантах осуществления эффекторная часть может включать гидрофильные и биосовместимые части, такие как поли(глицин), поли(оксазолин) или части ПЭГ. Иллюстративные структуры ("Y") приведены ниже:



$R = H$ , незамещенная или функциональная группа, содержащая алкильные группы;

$P$  и  $Q =$  одинаковые или разные функциональные группы для связывания лекарств, репортерных молекул и белка.

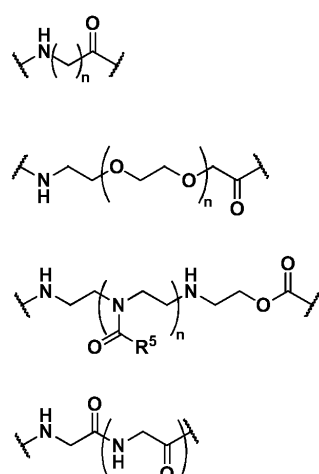
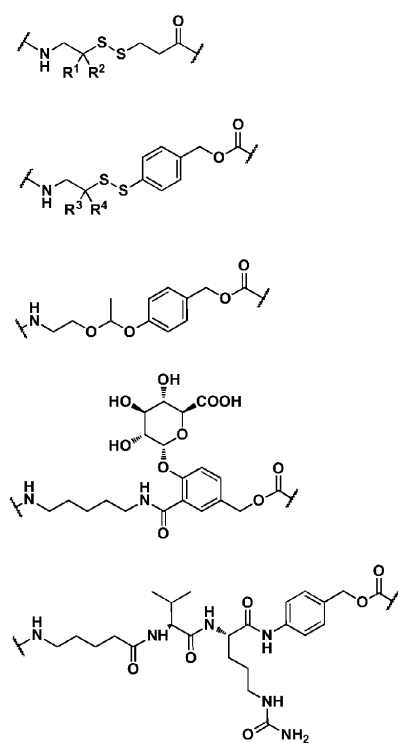
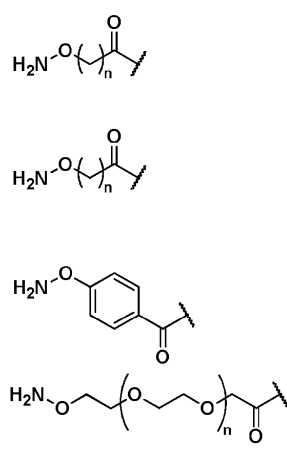
В некоторых вариантах осуществления эффекторная часть содержит аминоксигруппу, которая облегчает конъюгацию связывающего полипептида через стабильную оксимную связь. Примеры эффекторных частей, содержащих аминоксигруппы, представлены в данном документе в табл. 2.

В табл. 2 представлены примеры линкерных частей, функционализированных аминоксигруппами и примеры эффекторных аминокси-частей (где  $X$  может представлять собой любой линкер,  $Y$  представляет собой любой спейсер, и где  $X$  и/или  $Y$  являются необязательными)

Лекарство в настоящем документе может представлять собой любое лекарство из табл. 1 описания. Лекарство 1 и лекарство 2 могут быть одинаковыми или различными лекарствами.

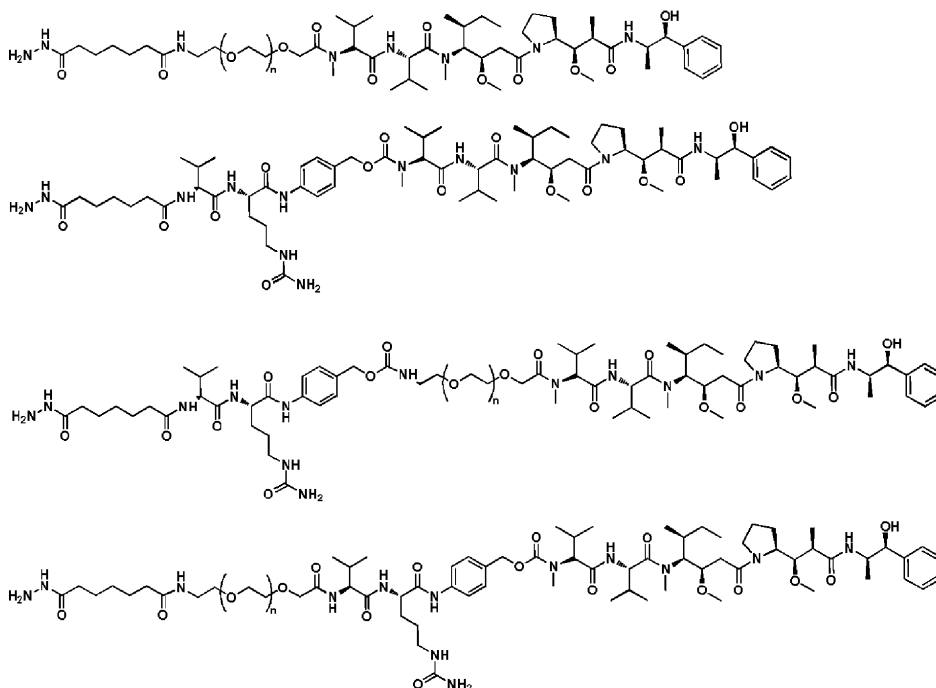
Таблица 2

[illegible]

	<p><b>Y =</b></p> 
<p><b>X =</b></p>  <p>R<sup>1-5</sup> = H, алкил или арил</p>	<p><b>Z =</b></p> 

В других вариантах осуществления эффекторная часть содержит гидразид и/или N-алкилированную гидразиновую группу для облегчения конъюгации со связывающим полипептидом через стабильную гидразоновую связь. Примеры эффекторных частей, содержащих аминоксигруппы, представлены ниже.

## Иллюстративные гидразиновые и/или гидразидные эффекторные части

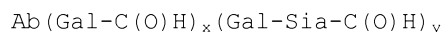


## VI. Конъюгация эффекторных частей со связывающими полипептидами

В некоторых вариантах осуществления эффекторные части конъюгируют (либо непосредственно, либо через линкерную группу) с окисленным гликаном (например, окисленным N-связанным гликаном) модифицированного связывающего полипептида (например, со сконструированным гликаном в N298 домена Fc антитела). Термин "окисленный гликан" означает, что спиртовой заместитель на гликане окислен с получением карбонильного заместителя. Карбонильный заместитель может вступать в реакцию с подходящим нуклеофильным азотом с образованием углерод-азотной двойной связи. Например, реакция карбонильной группы с аминоксигруппой или гидразиновой группой будет приводить к образованию оксима или гидразина соответственно. В одном варианте осуществления карбонильный заместитель представляет собой альдегид.

Подходящие окисленные гликаны включают окисленную галактозу и окисленную сиаловую кислоту.

В одном варианте осуществления модифицированный полипептид формулы (II) может иметь формулу (II)



Формула (II)

где A) Ab представляет собой антитело или другой связывающий полипептид, как определено в настоящем описании;

B) Gal является компонентом, происходящим из галактозы;

C) Sia является компонентом, происходящим из сиаловой кислоты;

D) x составляет от 0 до 5;

E) y составляет от 0 до 5,

где по меньшей мере один из x и y не равен 0.

Любой метод из данной области химии может быть использован для конъюгации эффекторной части (например, эффекторной части, включающей линкерную группу) с гликаном (см., например, статью Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press (1996), которая включена в настоящий документ в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления остаток сахара (например, остаток сиаловой кислоты или галактозы) гликана сначала окисляют (например, с использованием периодата натрия или обработки галактооксидазой) для создания реакционноспособной альдегидной группы. Эта альдегидная группа вступает в реакцию с аминоксигруппой или гидразиновой группой эффекторной части с образованием оксимного или гидразинового линкера соответственно. Примеры способов, использующих эту общую схему реакции, изложены в примерах 10-15.

В некоторых вариантах осуществления нативные или сконструированные гликаны связывающего полипептида сначала предварительно обрабатывают ферментом гликозилтрансферазой *in vitro* с получением концевых сахаридных остатков, который подходит для проведения реакции. Например, сначала может быть достигнуто сиалилирование с использованием сочетания галактозилтрансферазы (Gal T) и сиалилтрансферазы (Sial T). В некоторых вариантах осуществления 2-антенарные гликаны, у которых

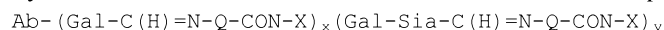
отсутствует галактоза (G0F или G0) или которые содержат только один галактозу (G1F или G1), могут быть преобразованы в галактозилированные или сиалилированные структуры более высокого порядка, подходящие для конъюгации (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F или G2S2).

Иллюстративная схема конъюгации для получения сиалилированных гликоконъюгатов показана на фиг. 25С. Остатки сиаловой кислоты вводят ферментативно в сайт, специфичный для гликана антитела (например, сконструированного гликана на N298 домена Fc), используя сочетание галактозилтрансферазы (Gal T) и сиалилтрансферазы (Sial T). Введенные остатки сиаловой кислоты затем окисляют с помощью низкой концентрации периодата натрия с получением реакционноспособных альдегидов сиаловой кислоты, подходящим образом взаимодействующих с линкерами лекарств (например, с аминоксигруппами линкеров лекарств) для образования конъюгатов антитело-лекарство (ADC) (например, связанных с оксимом ADC). Контролируя количество гликана и количество остатков сиаловой кислоты при ремоделировании *in vitro*, специалист в данной области техники может точно контролировать соотношение лекарство-антитело (DAR) в ADCs. Например, если примерно одну сиаловую кислоту добавляют на один 2-антенарный гликан (A1F) в каждой тяжелой цепи, может быть однотипно получено антитело или связывающий полипептид с DAR 2.

## VII. Модифицированные связывающие полипептиды

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предлагаются модифицированные полипептиды, которые являются продуктом конъюгации эффекторных частей, конъюгированных (либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент) с окисленным гликаном (например, окисленным N-связанным гликаном) измененного связывающего полипептида (например, со сконструированным гликаном на N298 домена Fc антитела).

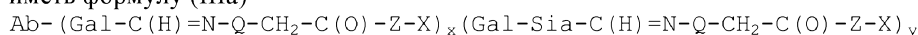
В одном варианте осуществления связывающий полипептид может иметь формулу (III)



Формула (III)

- где A) Ab представляет собой антитело, как определено в настоящем описании;  
 B) Q представляет собой NH или O;  
 C) CON является соединяющим фрагментом, как определено в настоящем описании;  
 D) X представляет собой терапевтический или диагностический агент, как определено в настоящем описании;  
 E) Gal является компонентом, происходящим из галактозы;  
 F) Sia является компонентом, происходящим из сиаловой кислоты;  
 G) x составляет от 0 до 5;  
 H) y составляет от 0 до 5,  
 где по меньшей мере один из x и y не равен 0.

В одном варианте осуществления связывающий полипептид может представлять собой формулу (III) и может иметь формулу (IIIa)

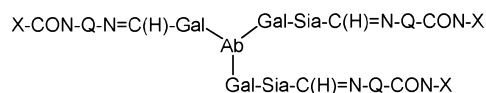


Формула (IIIa)

- где A) Ab представляет собой антитело;  
 B) Q представляет собой NH или O;  
 C) Z представляет собой Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-,  
 где i) Cys представляет собой компонент, происходящий из цистеинамида;  
 ii) MC представляет собой компонент, происходящий из цистеинамида;  
 iii) VC представляет собой компонент, происходящий из валина, соединенного с цитрулином;  
 iv) PABC представляет собой компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата;  
 v) X представляет собой терапевтический или диагностический агент, как определено в настоящем описании;  
 vi) a равно 0 или 1;  
 vii) b равно 0 или 1;  
 viii) c равно 0 или 1;  
 ix) f равно 0 или 1;

- D) X представляет собой терапевтический агент, как определено в настоящем описании;  
 E) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;  
 F) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;  
 G) x составляет от 0 до 5; и H) y составляет от 0 до 5,  
 где по меньшей мере один из x и y не равен 0.

Следует понимать, что формула (III) не подразумевает, что антитело, заместитель Gal и заместитель Gal-Sia соединены в цепь. Скорее, когда такие заместители присутствуют, антитело непосредственно соединено с каждым заместителем. Например, связывающий полипептид формулы (III), в которой x равен 1 и y равен 2, может иметь структурную организацию, показанную ниже:



Формула (III)

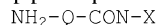
Заместитель CON в формуле (III) и его компоненты представляют собой описанное в отношении формулы (I) для эффекторных частей.

В одном варианте осуществления  $Q$  представляет собой  $NH$ . В другом варианте осуществления  $Q$  представляет собой  $O$ .

В одном варианте осуществления  $x$  равен 0.

Антитело Ab формулы (III) может представлять собой любое подходящее антитело, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления предлагается способ получения связывающего полипептида формулы (III), причем способ включает реакцию эффекторной части формулы (I)



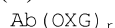
Формула (I)

где A) Q представляет собой NH или O;

В) CON является соединяющей частью;

С) X представляет собой терапевтический или диагностический агент, как определено в данном описании.

с модифицированным антителом формулы (II)

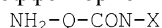


Формула (II)

где А) ОХГ представляет собой окисленный гликан;

В)  $r$  выбран из от 0 до 4:

В одном варианте осуществления предлагается способ получения связывающего полипептида формулы (III), причем способ включает реакцию эффекторной части формулы (I)



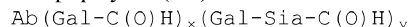
Формула (I)

где A) Q представляет собой NH или O;

В) CON является соединяющей частью:

С) X представляет собой терапевтический или диагностический агент, как определено в данном описании.

с модифицированным антителом формулы (IIa)



Формула (IIa)

где A) Ab представляет собой антитело, как описано в настоящем документе;

В) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;

С) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;

D)  $x$  составляет от 0 до 5;

Е)  $y$  составляет от 0 до 5,

где по меньшей мере один из  $x$  и  $y$  не равен 0.

## VIII. Способы лечения модифицированными антителами

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения или диагностики нуждающегося в этом больного, включающим введение эффективного количества связывающего полипептида, раскрытого в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются наборы и способы диагностики и/или лечения нарушений, например, опухолевых заболеваний у индивидуума млекопитающего, нуждающегося в таком лечении. Предпочтительно индивидуумом является человек.

Связывающие полипептиды по текущему раскрытию пригодны для ряда различных вариантов применения. Например, в одном варианте осуществления подлежащий использованию связывающий полипептид пригоден для уменьшения или устранения клеток, несущих эпитоп, узнаваемый связывающим доменом связывающего полипептида. В другом варианте осуществления подлежащие использованию связывающие полипептиды эффективны для снижения концентрации в кровотоке или устранения из нее растворимого антигена. В одном варианте осуществления связывающие полипептиды могут уменьшить размер опухоли, ингибировать рост опухоли и/или продлить время выживания животных, несущих опухоли. Соответственно, это изобретение также относится к способу лечения опухолей у человека или другого животного путем введения такому человеку или животному эффективного нетоксичного количества модифицированного антигена. Специалист в данной области техники способен с помощью обычных экспериментов определить, каким должно быть эффективное, нетоксичное количество модифицированного связывающего полипептида в целях лечения злокачественных опухолей. Например, терапевтически ак-

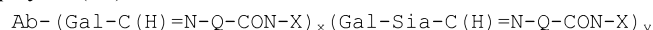
тивное количество модифицированного антитела или его фрагментов может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания (например, стадия I по сравнению со стадией IV), возраст, пол, медицинские осложнения (например, состояния или заболевания с ослабленным иммунитетом), масса индивидуума и способность модифицированного антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Режим дозирования можно регулировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, несколько отдельных доз можно вводить ежедневно или доза может быть пропорционально уменьшена по показаниям, предписанным терапевтической ситуацией.

В общем композиции, предлагаемые в данном описании, могут быть использованы для профилактического или терапевтического лечения опухоли, включающей любой антигенный маркер, который позволяет направленно действовать на раковые клетки с помощью модифицированного антитела.

#### IX. Способы введения модифицированных антител или их фрагментов

Способы получения и введения индивидууму связывающих полипептидов по текущему раскрытию хорошо известны специалистами в данной области техники или могут быть легко ими определены. Путь введения связывающих полипептидов по текущему раскрытию может представлять собой пероральный, парентеральный путь, введение путем ингаляции или местный путь. Термин "парентеральный", используемый в настоящем документе, включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Обычно предпочтительными являются внутривенные, внутриартериальные, подкожные и внутримышечные формы парентерального введения. В то время как все эти формы введения, очевидно, рассматриваются как входящие в объем текущего раскрытия, формой введения может быть раствор для инъекций, в частности, для внутривенного, или внутриартериального, или капельного введения. Как правило, пригодная фармацевтическая композиция для введения может включать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизирующий агент (например, человеческий альбумин) и т.д. Тем не менее в других методах, совместимых с указаниями настоящего документа, модифицированные антитела могут быть доставлены непосредственно в место аномальной клеточной популяции, тем самым увеличивая экспозицию больной ткани с терапевтическим агентом.

В одном варианте осуществления вводимый связывающий полипептид представляет собой связывающий полипептид формулы (III)



Формула (III)

где A) Ab представляет собой антитело, как определено в настоящем описании;

B) Q представляет собой NH или O;

C) CON является соединяющим фрагментом, как определено в настоящем описании; и

D) X представляет собой терапевтический или диагностический агент, как определено в настоящем описании;

E) Gal является компонентом, происходящим из галактозы;

F) Sia является компонентом, происходящим из сиаловой кислоты;

G) x составляет от 0 до 5;

H) y составляет от 0 до 5,

где по меньшей мере один из x и y не равен 0.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологические солевые и буферные среды. В композициях и способах по настоящему раскрытию фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются этим, 0,01-0,1 M и предпочтительно 0,05 M фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Другие обычные парентеральные носители включают натрий-фосфатные растворы, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Внутривенные носители включают жидкие и питательные наполнители, электролитные наполнители, такие как на основе декстрозы Рингера, и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные агенты, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п. Более конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (когда они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы легко вводиться с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях получения и хранения и предпочтительно должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем

поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ.

Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем введения активного соединения (например, модифицированного связывающего полипептида одного или в сочетании с другими активными агентами) в требуемом количестве в соответствующем растворителе с одним ингредиентом или с сочетанием ингредиентов, перечисленных в данном описании, по потребности, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора. Препараты для инъекций обрабатывают, помещают в контейнеры, такие как ампулы, пакеты, бутылки, шприцы или флаконы, и герметизируют в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области техники. Кроме того, препараты могут быть упакованы и проданы в форме набора, такого как описанные в одновременно рассматриваемых заявках U.S.S.N. 09/259337 и U.S.S.N. 09/259338, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки. Такие промышленные изделия могут предпочтительно иметь этикетки или вкладыши, указывающие на то, что связанные с ними композиции полезны для лечения индивидуума, страдающего от аутоиммунных или опухолевых заболеваний или предрасположенного к ним.

Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения описанных выше состояний варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, сайт-мишень, физиологическое состояние больного, является ли больной человеком или животным, другие вводимые лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, больной является человеком, но лечить также можно млекопитающих, не являющихся человеком, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозы можно титровать с помощью рутинных способов, известных специалистам в данной области техники, чтобы оптимизировать безопасность и эффективность.

Для пассивной иммунизации связывающим полипептидом дозировка может варьироваться в диапазоне, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг, и т.д.) от массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в диапазоне 1-10 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1 мг/кг. Дозы промежуточного продукта в указанных диапазонах также предназначены для включения в объем текущего раскрытия. Индивидуумам можно вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или согласно любой другой схеме, определенной эмпирическим анализом. Пример лечения включает введение во множественных дозах в течение длительного периода, например по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные схемы примеров лечения включают введение один раз в каждые две недели, или один раз в месяц, или один раз в каждые 3 до 6 месяцев. Примеры схем дозировки включают 1-10 или 15 мг/кг в последующие дни, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых методах два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания вводят одновременно, и в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов.

Связывающие полипептиды по настоящему изобретению могут быть введены несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы могут также быть нерегулярными по показаниям уровней измерения модифицированного полипептида в крови или связывания антигена у больного. В некоторых методах дозировка регулируется до достижения концентрации модифицированного связывающего полипептида в плазме 1-1000 мкг/мл и в некоторых методах 25-300 мкг/мл. Альтернативно, связывающие полипептиды можно вводить в виде композиции с поддерживаемым высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение. Для антител дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни антитела в организме больного. В общем гуманизированные антитела демонстрируют самый длинный период полужизни, затем идут химерные антитела и антитела, не относящиеся к человеку.

Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении композиции, содержащие антитела по настоящему изобретению или их смесь, вводят больному уже не в состоянии заболевания, чтобы повысить устойчивость больного. Такое количество определено как "профилактически эффективная доза". В этом варианте применения точные количества также зависят от состояния здоровья больного и общего иммунитета, но обычно находятся в диапазоне от 0,1 до 25 мг на дозу, особенно от 0,5 до 2,5 мг

на дозу. Относительно низкую дозу вводят при относительно нечастых интервалах в течение длительного периода времени. Некоторые больные продолжают получать лечение в течение всей оставшейся жизни. При терапевтическом применении относительно высокие дозы (например, от приблизительно 1 до 400 мг/кг антитела на дозу, с дозами от 5 до 25 мг, более широко используемыми для радиоиммунноконъюгатов, и с более высокими дозами для модифицированных антител с лекарством цитотоксином) с относительно короткими интервалами иногда требуются до тех пор, пока не уменьшается или прекращается прогрессия заболевания и предпочтительно пока у больного не появляется частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого больному можно вводить дозы в профилактическом режиме.

Связывающие полипептиды по текущему раскрытию необязательно могут быть введены в сочетании с другими агентами, которые эффективны в лечении нарушения или состояния у нуждающихся в лечении (например, профилактическом или терапевтическом). Эффективные дозы для однократного лечения (т.е. терапевтически эффективные количества) меченых  $^{90}\text{Y}$  модифицированных антител по текущему раскрытию находятся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 75 мКи, более предпочтительно между приблизительно 10 и приблизительно 40 мКи. Эффективные дозы  $^{131}\text{I}$ -модифицированных антител для однократного лечения, не разрушающие костный мозг, лежат в диапазоне между приблизительно 5 и приблизительно 70 мКи, более предпочтительно между приблизительно 5 и приблизительно 40 мКи. Эффективные дозы  $^{131}\text{I}$ -меченых антител для однократного лечения, разрушающие костный мозг (т.е. может потребоваться трансплантация аутологичного костного мозга), лежат в диапазоне между приблизительно 30 и приблизительно 600 мКи, более предпочтительно между приблизительно 50 и приблизительно менее 500 мКи. При соединении с химерными антителами благодаря их более длительному периоду полужизни в кровотоке в партнерстве с мышинными антителами эффективные дозы химерных антител, меченных  $^{131}\text{I}$ , для однократного лечения без разрушения костного мозга находятся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 40 мКи, более предпочтительно менее приблизительно 30 мКи. Критерии визуализации, например, для метки  $^{111}\text{In}$ , как правило, составляют менее приблизительно 5 мКи.

В то время как связывающие полипептиды можно вводить, как описано непосредственно выше, следует подчеркнуть, что в других вариантах осуществления связывающие полипептиды могут быть введены в остальном здоровым больным в качестве терапии первой линии. В таких вариантах осуществления связывающие полипептиды могут быть введены больным, имеющим нормальные или средние резервы красного костного мозга, и/или больным, которые не подвергались и не подвергаются другим видам терапии. При применении в настоящем документе введение модифицированных антител или их фрагментов в связи или в сочетании с дополнительной терапией означает последовательное, совместное, совпадающее, сопутствующее, сопровождающее или одновременное введение или применение дополнительной терапии и описанных антител. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что введение или применение различных компонентов сочетанной терапевтической схемы может быть рассчитано по времени для повышения общей эффективности лечения. Например, химиотерапевтические агенты могут быть введены в виде стандартных хорошо известных курсов лечения с последующим введением в пределах нескольких недель радиоиммунноконъюгатов по настоящему изобретению. С другой стороны, связанные с цитотоксином связывающие полипептиды можно вводить внутривенно с последующим направленным на опухоль внешним пучком излучения. В еще одних вариантах осуществления модифицированный связывающий полипептид можно вводить одновременно с одним или несколькими выбранными химиотерапевтическими агентами при одном посещении больницы. Специалист в данной области техники (например, опытный онколог) легко может различить эффективные комбинированные терапевтические схемы без излишнего экспериментирования на основании выбранной дополнительной терапии и указаний данного описания.

В связи с этим следует иметь в виду, что сочетание связывающих полипептидов и химиотерапевтического агента может вводиться в любом порядке и в пределах любого периода времени, которое обеспечивает терапевтическое преимущество для больного. Это означает, что химиотерапевтический агент и связывающие полипептиды можно вводить в любом порядке или одновременно. В отдельных вариантах осуществления связывающие полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть введены больным, которые ранее подвергались химиотерапии. В еще одних вариантах осуществления связывающие полипептиды и химиотерапевтические агенты могут вводиться, по существу, одновременно или параллельно. Например, больной может получать указанные связывающие полипептиды при прохождении курса химиотерапии. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированное антитело может быть введено в пределах одного года после любого химиотерапевтического агента или лечения. В других предпочтительных вариантах осуществления связывающий полипептид может быть введен в пределах 4, 3, 2 или 1 недели после любого химиотерапевтического агента или лечения. В еще одних вариантах осуществления связывающие полипептиды могут быть введены в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 дня после выбранного химиотерапевтического агента или лечения. Кроме того, следует понимать, что эти два агента или пре-

парата могут быть введены больному в пределах не более нескольких часов или минут (т.е., по существу, одновременно).

Кроме того, следует понимать, что связывающие полипептиды по текущему раскрытию могут быть использованы в сочетании или в соединении с любым химиотерапевтическим агентом или агентами (например, чтобы обеспечить комбинированный терапевтический режим), что исключает, снижает, ингибирует или контролирует рост опухолевых клеток *in vivo*. Примеры химиотерапевтических агентов, которые совместимы с текущим раскрытием, включают алкилирующие агенты, алкалоиды барвинка (например, винкристин и винбластин), прокарбазин, метотрексат и преднизон. Сочетание четырех лекарств МОРР (мехлетиамин (азотистый иприт), винкристин (онковин), прокарбазин и преднизон) является очень эффективным при лечении различных типов лимфомы и включает предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. У устойчивых к МОРР больных могут быть использованы АВВД (например, адриамицин, блеомицин, винбластин и дакарбазин), ChlVPP (хлорамбуцил, винбластин, прокарбазин и преднизон), CABS (ломустин, доксорубин, блеомицин и стрептозотозин), МОРР плюс АВВД, МОРР плюс АВВ (доксорубин, блеомицин и винбластин) или BСVPP (кармустин, циклофосфамид, винбластин, прокарбазин и преднизон). Arnold S. Freedman and Lee M. Nadler, *Malignant Lymphomas*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine* 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al., eds., 13<sup>th</sup> ed. 1994) and V.T. DeVita et al., (1997) и цитируемые там ссылки для стандартного дозирования и режима. Эти способы лечения могут быть использованы без изменений или изменены по необходимости для конкретного больного в сочетании с одним или более связывающими полипептидами по текущему раскрытию, как описано в настоящем документе.

Дополнительные схемы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают использование одиночных алкилирующих агентов, таких как циклофосфамид или хлорамбуцил, или сочетаний, таких как CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизон), CHOP (CVP и доксорубин), С-МОРР (циклофосфамид, винкристин, преднизон и прокарбазин), CAP-BOP (CHOP плюс прокарбазин и блеомицин), m-BACOD (CHOP плюс метотрексат, блеомицин и лейковорин), ProMACE-MОРР (преднизон, метотрексат, доксорубин, циклофосфамид, этопозид и лейковорин плюс стандартный МОРР), ProMACE-CytaBOM (преднизон, доксорубин, циклофосфамид, этопозид, цитарабин, блеомицин, винкристин, метотрексат и лейковорин) и MACOP-B (метотрексат, доксорубин, циклофосфамид, винкристин, фиксированная доза преднизона, блеомицин и лейковорин). Специалисты в данной области техники легко могут определить стандартные дозы и схемы для каждого из этих режимов. CHOP также сочетают с блеомицином, метотрексатом, прокарбазином, азотистым ипритом, цитозинарабинозидом и этопозидом. Другие совместимые химиотерапевтические агенты включают, но не ограничиваются этим, 2-хлордезоксиаденозин (2-CDA), 2'-дезоксикоформин и флударабин.

Для больных с промежуточной стадией и высокой стадией NHL, которые не достигают ремиссии или имеют рецидив, используется терапия спасения. При терапии спасения используют лекарства, такие как цитозинарабинозид, карбоплатин, цисплатин, этопозид и ифосфамид, получаемые по отдельности или в сочетании. При рецидивирующих или агрессивных формах некоторых опухолевых заболеваний часто используются следующие протоколы: IMVP-16 (ифосфамид, метотрексат и этопозид), MIME (метил-gag, ифосфамид, метотрексат и этопозид), DHAP (дексаметазон, высокие дозы цитарабина и цисплатин), ESHAP (этопозид, метилпреднизолон, HD цитарабин, цисплатин), SEPP(B) (циклофосфамид, этопозид, прокарбазин, преднизон и блеомицин) и CAMP (ломустин, митоксантрон, цитарабин и преднизон), каждый с хорошо известными уровнями дозирования и схемами.

Количество химиотерапевтического агента, используемого в сочетании с модифицированными антителами по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от субъекта или может быть введено в соответствии с тем, что известно в данной области техники. См., например, Bruce A. Chabner et al., *Antineoplastic Agents*, in Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9<sup>th</sup> ed. 1996).

Как обсуждалось ранее, связывающие полипептиды по настоящему изобретению, их иммунореактивные фрагменты или их рекомбинантные белки можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения нарушений у млекопитающих *in vivo*. В связи с этим следует понимать, что раскрытые связывающие полипептиды можно составлять так, чтобы облегчать введение и способствовать стабильности активного агента.

Предпочтительно фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением включают фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п. Для целей настоящего изобретения фармацевтически эффективное количество модифицированного связывающего полипептида, его иммунореактивного фрагмента или его рекомбинантного белка, конъюгированного или не конъюгированного с терапевтическим агентом, должно поддерживаться до среднего количества, достаточного для достижения эффективного связывания с антигеном и достижения преимущества, например, в улучшении симптомов заболевания или нарушения или в обнаружении вещества или клетки. В случае опухолевых клеток модифицированный связывающий полипептид может предпочтительно обладать способностью к взаимодействию с выбранными иммунореактивными антигенами на опухолевых или иммунореактивных клетках и обеспе-

чивать увеличение гибели этих клеток. Конечно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены в виде одной или нескольких доз для обеспечения фармацевтически эффективного количества модифицированного связывающего полипептида.

В соответствии с объемом настоящего изобретения связывающие полипептиды согласно изобретению могут быть введены человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического или профилактического эффекта. Связывающие полипептиды по изобретению можно вводить такому человеку или другому животному в обычной дозированной форме, полученной путем объединения антитела по изобретению с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными способами. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя диктуется количеством активного ингредиента, с которым он должен быть объединен, путем введения и другими хорошо известными переменными. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что смесь, содержащая один или более видов связывающих полипептидов, описанных в данном документе, может предлагаться как особенно эффективная.

#### **Х. Экспрессия связывающих полипептидов**

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим связывающие полипептиды, описанные в настоящем документе. Предлагается также способ получения связывающего полипептида, включающий экспрессию этих полинуклеотидов.

Полинуклеотиды, кодирующие связывающие полипептиды, описанные в данном документе, как правило, вставляют в экспрессионный вектор для введения в клетки-хозяева, которые могут быть использованы для получения желаемого количества заявленных антител или их фрагментов. Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к экспрессионным векторам, включающим полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, и к клеткам-хозяевам, включающим эти векторы и полинуклеотиды.

Термин "вектор" или "экспрессионный вектор" используется в настоящем документе в описании и формуле изобретения для обозначения векторов, используемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения и экспрессии желаемого гена в клетке. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы легко могут быть выбраны из группы, состоящей из плазмид, бактериофагов, вирусов и ретровирусов. В общем векторы, совместимые с настоящим изобретением, могут включать маркер селекции, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и способности к вхождению и/или репликации в эукариотических или прокариотических клетках.

Многочисленные системы экспрессионных векторов могут быть использованы в целях настоящего изобретения. Например, один класс векторов использует элементы ДНК, которые происходят от вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус корьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (SV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие классы предполагают использование полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Кроме того, клетки, которые интегрировали ДНК в свои хромосомы, могут быть отобраны путем введения одного или более маркеров, которые позволяют отбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечить прототрофию ауксотрофного хозяина, биоцидную устойчивость (например, к антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген маркера селекции может быть либо прямо связан с последовательностями ДНК, которые будут экспрессироваться, либо введен в ту же клетку с помощью котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК могут быть также необходимы дополнительные элементы. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также промоторы, энхансеры и сигналы терминирования транскрипции. В особенно предпочтительных вариантах осуществления клонированные гены переменных областей вставляют в экспрессионный вектор вместе с синтетической константной областью тяжелой и легкой цепей генов (предпочтительно человека), как описано выше.

В других предпочтительных вариантах осуществления связывающие полипептиды согласно изобретению могут быть экспрессированы с помощью полицистронных конструктов. В таких системах экспрессии множественные представляющие интерес генные продукты, такие как тяжелые и легкие цепи антител, могут быть получены с одного полицистронного конструкта. Эти системы преимущественно используют внутренний сайт посадки рибосом (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов по настоящему изобретению в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES описаны в патенте США № 6193980, который включен в настоящий документ в качестве ссылки. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что такие экспрессионные системы могут быть использованы для эффективного получения полного спектра полипептидов, раскрытых в настоящем изобретении.

Обычно после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующих антитело или его фрагмент, экспрессионный вектор может быть введен в подходящую клетку-хозяина. Это означает, что клетки-хозяева могут быть трансформированы. Введение плазмиды в клетку-хозяина может быть осуществлено различными методами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Они вклю-

чают, но не ограничиваются этим, трансфекцию (в том числе электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клеток с внешней ДНК, микроинъекцию и инфицирование интактным вирусом. См., Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors", Chapter 24.2, p. 470-472, Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Наиболее предпочтительным введением плазмиды в хозяина является введение с помощью электропорации. Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для получения легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют в отношении синтеза белка тяжелой и/или легкой цепи. Примеры методов анализа включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или анализ с помощью сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS), иммуногистохимию и т.п.

При применении в настоящем документе термин "трансформация" должен использоваться в широком смысле для обозначения введения ДНК в реципиентную клетку-хозяина, которая изменяет генотип и, следовательно, приводит к изменениям в клетке-реципиенте.

По тем же причинам "клетки-хозяева" относятся к клеткам, трансформированным векторами, сконструированными с использованием методов рекомбинантных ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях методов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев, термины "клетка" и "клеточная культура" используются как взаимозаменяемые для обозначения источника антител, если ясно не указано иное. Другими словами, получение полипептида из "клеток" может означать либо из осажденных целых клеток, либо из клеточной культуры, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии антитела, происходит от млекопитающих; специалисты в данной области техники могут определить конкретные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии в них требуемого генного продукта. Примеры линий клеток-хозяев включают, но не ограничиваются этим, линии DG44 и DUXB11 (линии яичника китайского хомячка, DHFR-минус), HeLa (рака шейки матки человека), CV1 (линию почек обезьяны), COS (производное CV1 с Т-антигеном SV40), R1610 (фибробластов китайского хомячка) BALBC/3T3 (фибробластов мышей), HAK (линию почек хомяка), SP2/O (мышиную миелому), BFA-IcIBPT (эндотелиальных клеток крупного рогатого скота), RAJI (лимфоцитов человека), 293 (почки человека). В одном варианте осуществления предлагается линия клеток для измененного гликозилирования, например, фукозилирования, для экспрессии в ней антитела (например, PER.C6.RTM. (Crucell) или клеточные линии CHO с FUT8-нокаутом (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). В одном варианте осуществления могут быть использованы клетки NS0. Клетки CHO являются особенно предпочтительными. Линий клеток-хозяев, как правило, доступны из коммерческих источников, американской коллекции тканевых культуры или из опубликованной литературы.

Получение *in vitro* позволяет масштабировать процесс до данных больших количеств нужных полипептидов. Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях тканевого культивирования известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в аэролитном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием или иммобилизованные или интегрированные клеточные культуры, например, в полые волокна, микрокапсулы, на агарозные микрогранулы или керамические картриджи. Если необходимо и/или желательно, растворы полипептидов могут быть очищены обычными методами хроматографии, например гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и/или (иммуно)аффинной хроматографией.

Гены, кодирующие связывающие полипептиды по изобретению, также могут быть экспрессированы в клетках, не относящихся к млекопитающим, таких как бактерии или дрожжи, или в растительных клетках. В связи с этим следует иметь в виду, что различные одноклеточные микроорганизмы, не относящиеся к млекопитающим, такие как бактерии, также могут быть трансформированы; т.е. те из них, которые способны к выращиванию в культурах или к ферментации. Бактерии, которые восприимчивы к трансформации, включают членов энтеробактерий, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, такие как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Кроме того, следует понимать, что при экспрессии в бактериях полипептиды могут становиться частью телец включения. Полипептиды должны быть выделены, очищены и затем собраны в функциональные молекулы.

Кроме прокариот, могут быть также использованы эукариотные микробы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, являются наиболее часто используемыми среди эукариотных микроорганизмов, хотя общедоступным является ряд других штаммов. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используется, например, плазмида YRp7 ((Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Эта плазмида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективным маркером мутантный штамм дрожжей с отсутствием способности расти в триптофане, например, ATCC No. 44076 или PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Наличие повреждения TRP1 в качестве характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина затем обеспечивает эффективную среду для детектирования трансформации по росту в отсутствие триптофана.

### Примеры

Настоящее изобретение далее иллюстрируется следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как дальнейшее ограничение. Содержание списка последовательностей, фигур и все ссылки, патенты и опубликованные патентные заявки, приведенные в данном документе, включены в него в качестве ссылки.

#### Пример 1.

Дизайн, получение и характеристика мутантных гипергликозилированных антител 2C3 против CD-52.

Множественные мутации с гипергликозилированием были созданы в тяжелой цепи антитела 2C3 против CD-52 с целью добавления объемной группы к интерфейсу взаимодействия (например, сайту связывания FcRn для модуляции фармакокинетики антитела), для модуляции эффекторной функции антитела путем изменения его взаимодействия с FcγR или для введения новой химической модификации подпоследовательности сайта поперечной сшивки для конъюгации эффекторной части, включая, но не ограничиваясь этим, конъюгацию лекарств, токсинов, цитотоксических агентов и радионуклидов. Гипергликозилированные мутанты 2C3 представлены в табл. 3.

Таблица 3

Гипергликозилированные мутанты 2C3 против CD-52

Мутация	Требуемое преимущество	Применение
A114N	Гликозилирование в Asn-Ser-Thr	1) Контроль 2) Конъюгация эффекторной части
Y436T	Гликозилирование в Asn434 Ингибирование связывания FcRn	1) Трансплантация и другие показания, которые требуют короткого периода полужизни
Y436S	Гликозилирование в Asn434 Ингибирование связывания FcRn	1) Трансплантация и другие показания, которые требуют короткого периода полужизни
S440N	Гликозилирование в Asn-Leu-Ser	1) Контроль 2) Конъюгация эффекторной части
S442N	Гликозилирование в Asn-Leu-Ser	1) Контроль 2) Конъюгация эффекторной части
Добавление NGT к C-концу	Гликозилирование	1) Контроль 2) Конъюгация эффекторной части
S298N/Y300S	Гликозилирование в Asn298 Снижение эффекторной функции	1) Снижение эффекторной функции 2) Конъюгация эффекторной части

#### 1A. Создание гипергликозилированных мутантов антитела 2C3 против CD-52.

Мутация A114N, обозначаемая на основе системы нумерации Кабата, была введена в домен CH1 антитела 2C3 с помощью мутагенной ПЦР. Для создания полноразмерного антитела домен VH плюс мутантный остаток A114N вставляли независимым от лигирования клонированием (LIC) в вектор pENTR-LIC-IgG1, кодирующий домены 1-3 CH антитела. Все другие мутации вводили в pENTR-LIC-IgG1 путем сайт-направленного мутагенеза с помощью набора QuikChange для сайт-направленного мутагенеза (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). VH WT 2C3 клонировали в мутантные векторы с помощью LIC. Полноразмерных мутантов клонировали в экспрессионный вектор pCER4(-E+I)Dest клонированием Gateway. Мутации Fc обозначали на основе системы нумерации EU. Мутации подтверждали секвенированием ДНК. Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей WT 2C3 и мутантных тяжелых цепей 2C3 приведены в табл. 4. Мутантные аминокислоты выделены серым цветом и консенсусные сайты-мишени гликозилирования, созданные с помощью мутации, подчеркнуты.

Таблица 4

## Аминокислотные последовательности антител 2С3 против CD-52

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
1	Легкая цепь WT против CD-52	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLLQKPGQSPQRLIYL VSKLDSGVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRL EIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
2	Тяжелая цепь WT против CD-52	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDWF GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDIL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	Тяжелая цепь A114N против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDWF GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDIL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	Тяжелая цепь Y436S против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDWF GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDIL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	Тяжелая цепь S440N против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDWF GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDIL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

6	Тяжелая цепь S442N против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLVWVGQIRLKSNNTATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	Тяжелая цепь NGT против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLVWVGQIRLKSNNTATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK <del>NGT</del>
8	Тяжелая цепь S298N/Y300S против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLVWVGQIRLKSNNTATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Мутанты и контроль WT трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в формате 6-луночного планшета. Как показано на фиг. 9, обнаруживаемый уровень экспрессии составлял ~0,1 мкг/мл при анализе с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Экспрессию мутантов в кондиционных средах измеряли также по захвату протеином А на Вiascore. Концентрацию определяли с использованием отклика диссоциации через 6 мин после инъекции в иммобилизованный протеин А. Продуцируемое CHO WT 2C3, серийно разведенное в средах от 90 мкг/мл до 1,5 нг/мл, использовали в качестве стандартной кривой. Концентрации рассчитывали вплоть до ~0,2 мкг/мл с помощью калибровочной кривой с использованием 4-параметрической подгонки. Как показано на фиг. 9, относительные уровни экспрессии были низкими и в целом соответствовали результатам Вестерн-блоттинга.

#### 1В. Верификация гипергликозилирования.

Для определения, были ли введены дополнительные сайты гликозилирования путем мутации, мутант 2C3 и белки дикого типа обрабатывали универсальным дегликозилирующим ферментом PNG-азой F и образцы белка анализировали с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Как показано на фиг. 10, только мутант A114N имел увеличенную кажущуюся молекулярную массу, что указывает на присутствие дополнительного N-связанного углевода.

Препараты антител получали в небольшом масштабе для очистки мутантов 2C3 для дальнейшей проверки введения сайта гликозилирования. Как показано на фиг. 11, с помощью SDS-PAGE подтверждено, что только мутант A114N имел введенные дополнительные сайты гликозилирования.

#### 1С. Связывающие свойства мутантов 2C3 против CD-52.

Вiascore использовали для сравнения связывающих свойств очищенных белков. FcRn-HPC4 мыши и очищенный SEC FcRn-HPC4 человека иммобилизовали на чипе CM5 через связывание амина. Каждое антитело разводили до 200, 50 и 10 нМ и наносили поверх иммобилизованных рецепторов Fc. Campath, продуцируемые в CHO WT 2C3, и обработанные DEPC Campath включали в качестве положительных и отрицательных контролей. Как показано на фиг. 13, мутант Y436S проявлял приблизительно 2-кратное снижение связывания с FcRn человека. Интересно, что связывание этого мутанта с FcRn мыши не было затронуто. Ни одна из других мутаций 2C3 не оказывала существенного влияния на связывание FcRn человека или мыши.

Вiascore использовали для сравнения антигенсвязывающих свойств очищенных белков с помощью анализа Вiascore связывания пептида 741 CD-52. Пептид 741 CD-52 и контрольный пептид 777 иммобилизовали на чипе CM5. Антитела серийно разводили в 2 раза от 60 до 0,2 нМ в HBS-EP и вводили в двух параллелях в течение 3 мин с последующей диссоциацией в течение 5 мин в буфере при скорости потока 50 мкл/мин. Лот GLD52 17200-084 включали в качестве контроля. Поверхность регенерировали одним пульсом 40 mM HCl. Использовали модель 1:1 для подгонки 7,5 к кривым 0,2 нМ. Как показано на фиг. 16, мутант A114N имел немного более высокую аффинность связывания CD-52, в то время как мутант NGT имел немного более высокую аффинность по сравнению с остальной частью мутантов в этом

анализе. Анализ Вiasome связывания пептида 741 CD-52 повторяли с белком, очищенным в более масштабном количестве. Как показано на фиг. 17, мутант A114N характеризовался связыванием пептида CD-52, сравнимым с 2C3 WT.

#### 1D. Характеристика заряда мутанта A114N.

Изоэлектрическое фокусирование (IEF) проводили с целью охарактеризовать заряд мутантов 2C3. Очищенный белок пропускали через иммобилизованный градиент pH (pH 3-10) акриламидных (IPG) гелей. Как показано на фиг. 18A, A114N, как установлено, имел больше отрицательных зарядов, вероятно, из-за остатков сиаловой кислоты. Интактные данные MS подтвердили сложную структуру с сиаловыми кислотами у мутанта A114N. В отличие от этого, 2C3 WT, как показано, имел G0F и G1F в качестве доминантных видов гликозилирования (фиг. 18C и D соответственно).

#### Пример 2. Получение гипергликозилированных мутантов в каркасах нескольких антител.

В дополнение к антителу 2C3 против CD-52, мутация A114N была сделана в каркасах нескольких других антител для подтверждения того, что уникальный сайт гипергликозилирования может быть введен в неродственные последовательности варибельных доменов тяжелой цепи. Гипергликозилированные мутанты против TEM1, против FAP и против Her2 представлены в табл. 5.

Таблица 5

Мутанты A114N и/или S298N, созданные в нескольких каркасах неродственных антител

Мутация	Антитело	Желаемое преимущество	Применение
A114N	Против TEM1 Против FAP Против Her2	Дополнительный сайт гликозилирования у колена шарнира тяжелой цепи для сайт-специфической конъюгации, опосредуемой углеводами	1) Контроль 2) Конъюгация аминоксигментов через экспонированную сиаловую кислоту или группу галактозы (SAM или GAM)
S298N/ T299A/ Y300S (NNAS)	Против Her2	Перемещение гликозилирования с Asn297 на сконструированный Asn298. Ожидается, что экспозиция с растворителем и сложные углеводы у S298N предоставят сайт конъюгации и средство для удаления эффекторной функции	1) Конъюгация аминоксигментов через экспонированную сиаловую кислоту или группу галактозы (SAM или GAM) 2) Пониженная эффекторная функция
A114N/ NNAS	Против Her2	Возможность повышения выхода конъюгации с двумя сайтами конъюгации	1) Контроль 2) Конъюгация аминоксигментов через экспонированную сиаловую кислоту или группу галактозы (SAM или GAM)

#### 2A. Создание гипергликозилированных мутантов антител против TEM1 и против FAP.

Мутацию A114N, обозначенную на основе системы нумерации Кабата, вводили в домен CH1 антител против TEM1 и против FAP с помощью мутагенной ПЦР. Для создания полноразмерного антитела мутантный VH плюс остаток 114 вставляли независимым от лигирования клонированием (LIC) в вектор pENTR-LIC-IgG1, кодирующий домены 1-3 CH антитела. Полноразмерных мутантов затем клонировали в экспрессионный вектор pCEP4(-E+I)Dest клонированием Gateway. Мутации подтверждали секвениро-

ванием ДНК. Аминокислотные последовательности антитела против TEM1 дикого типа и мутантных тяжелых и легких цепей приведены в табл. 6. Мутантные аминокислоты выделены серым цветом и консенсусные сайты-мишени гликозилирования, созданные с помощью мутации, подчеркнуты.

Таблица 6

**Аминокислотные последовательности антител  
против TEM1 и против FAP**

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
9	Легкая цепь WT против TEM1 (клон #187)	EIVLTQSPGTL <del>SL</del> SPGERATL <del>SCR</del> ASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRISGSGSGTIDFLL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	Тяжелая цепь WT против TEM1 (клон #187)	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLLEYIGYIYYTGSAINPSLQSRVTISVDTS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGM <del>MDV</del> WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN <del>NG</del> KEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	A114N против TEM1	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLLEYIGYIYYTGSAINPSLQSRVTISVDTS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGM <del>MDV</del> WGQGTITVTVSS <del>AST</del> KGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN <del>NG</del> KEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Мутанты и контроль дикого типа трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в формате тройных флаконов и очищали на колонках протеина A HiTrap (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). При анализе с помощью A280 на спектрофотометре NanoDrop экспрессия антител против FAP A114N и против FAP A114C составляла приблизительно 3 мкг/мл и приблизительно 1 мкг/мл соответственно. Экспрессия антитела A114N против TEM1 составляла приблизительно 0,04 мкг/мл.

#### 2B. Верификация гипергликозилирования.

Для подтверждения того, что дополнительный сайт гликозилирования был введен в мутанты A114N, очищенный белок от мутантов A114N анализировали в восстанавливающем SDS-PAGE вместе с контрольным белком дикого типа. Один дополнительный сайт гликозилирования должен добавлять 2000-3000 Да к молекулярной массе тяжелой цепи. Как показано на фиг. 20, SDS-PAGE показал, что полосы тяжелых цепей мутантов A114N против FAP и против TEM1 имели увеличенную кажущуюся молекулярную массу, соответствующую успешному введению дополнительного сайта гликозилирования в оба антитела.

#### 2C. Создание гипергликозилированных мутантов антитела против Her2.

Антитела против Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS и Her-2 WT были созданы независимым от лигирования клонированием. Домен VH герцептина синтезировали и амплифицировали ПЦР с двумя совместимыми с LIC наборами праймеров, либо WT, либо несущими мутацию A114N. Для получения полноразмерного антитела амплифицированные вставки VH (WT или A114N) клонировали в два вектора pENTR, кодирующих домены 1-3 CH, pENTR-LIC-IgG1 WT и pENTR-LIC-IgG1 NNAS, с получением трех полноразмерных мутантов (A114N, NNAS, A114N/NNAS) и контроля WT в качестве исходных клонов на pENTR. Этих мутантов клонировали в экспрессионный вектор pCEP4(-E+I)Dest с помощью клонирования Gateway. Мутации подтверждали секвенированием ДНК. Аминокислотные последовательности антитела против Her-2 дикого типа и мутантных тяжелой и легкой цепей приведены в табл. 7. Мутантные аминокислоты выделены серым цветом и консенсусные сайты-мишени гликозилирования, созданные с помощью мутации, подчеркнуты.

Таблица 7

## Аминокислотные последовательности антител против Her-2

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
12	Легкая цепь WT против Her-2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSQVPSRFSGRSGIDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	Тяжелая цепь WT против Her-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Тяжелая цепь A114N против Her-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Тяжелая цепь NNAS против Her-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN <del>NNAS</del> RVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	Тяжелая цепь A114N/NNAS против Her-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN <del>NNAS</del> RVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

## 2D. Экспрессия гипергликозилированного мутанта антитела A114N против Her-2.

Антитело A114N против Her-2 и конструкторы дикого типа трансфицировали липофектамин-2000 (отношение реагента к ДНК 2,5:1) и XtremeGene HP (отношение реагента к ДНК 3:1) в клетки HEK293-EBNA в 12 тройных флаконах. Измерение Octet аликвот из кондиционных сред (CM) на 3-й день показало, что экспрессия белка в 6 флаконах соответствует как для липофектамина-2000, так и для XtremeGene HP. Как показано в табл. 8, общая эффективность трансфекции была приблизительно на 30% выше в случае XtremeGene HP. Кондиционные среды, собранные на 3-й день, объединяли в случае обоих вариантов трансфекции и очищали с помощью колонки с протеином А. Измерение Octet выявило 1,8 мкг/мл антитела в содержащей сыворотку имитационной среде по сравнению с 0 мкг/мл в средах, не имитирующих сыворотку.

Таблица 8

Экспрессия гипергликозилированного мутанта A114N против Her-2

		Липофектамин-2000	XtremeGene HP
Очищенный белок с колонки протеин А	Концентрация (мг/мл)	1,72	3,18
	Объем (мл)	3,5	3,5
	Суммарный белок (мг)	6,02	11,13
Белок с заменой буфера	Концентрация (мг/мл)	15,59	16,86
	Объем (мл)	0,2	0,36
	Суммарный белок (мг)	3,1	6,07
	% открытия	51,8	54,5

Кондиционные среды на 6-й день собирали и очищали отдельно для каждого из вариантов трансфекции. Для обоих элюатов проводили замену буфера отдельно на PBS, pH 7,2, и концентрировали в ~15 раз с использованием колонок Amicon-4 (с 50 кДа отсечением). В СМ на 6-й день выявлен более высокий уровень экспрессии по сравнению с СМ на 3-й день. Как показано в табл. 8, суммарно 3 мг A114N герцептина с концентрацией 15,59 мг/мл (при трансфекции с помощью липофектамина) и 6 мг герцептина A114N с концентрацией 16,86 мг/мл (при трансфекции с помощью XtremeGene HP) получали из кондиционных сред на 6-й день для дополнительных последующих вариантов применения, таких как конъюгация антитело-лекарство.

#### 2Е. Анализ SDS-PAGE и HIC мутанта A114N против Her-2.

Перед конъюгацией очищенный герцептин A114N характеризовали на SDS-PAGE и HIC (гидрофобной хроматографии). Как показано на фиг. 21, качество очищенного герцептина A114N определено как подходящее для ниже лежащих вариантов применения.

#### 2F. Конъюгация со сконструированным гликозилированием.

Было показано, что а) сайт гликозилирования введен в положение 114 по Кабату в антителе против TEM1; б) мутант A114N характеризовался гипергликозилированием тяжелой цепи, показанным с помощью восстанавливающего SDS-PAGE; и с) гипергликозилированный мутант A114N имел сложную углеводную структуру по данным интактной ЖХ/МС, включая концевые сиаловые кислоты и галактозу, которые идеально подходят для конъюгации SAM и GAM. Для подтверждения того, что сконструированный сайт гликозилирования пригоден для конъюгации, антитело A114N против TEM1 конъюгировали с 5 кДа ПЭГ с помощью аминоксигруппы. Как показано на фиг. 22, ПЭГ был успешно конъюгирован с антителом A114N против TEM1 через аминоксисвязь. Этот мутант также успешно получен на каркасах антител 2C3 против FAP и против CD-52 (не показано). Эти данные показывают, что сайт гликозилирования в N114 пригоден для конъюгации эффекторных фрагментов.

#### Пример 3. Создание мутантов Fc S298N/Y300S.

Разработаны и созданы сконструированные варианты Fc, в которых новый сайт гликозилирования введен в положение Ser 298 по EU, следующим за природным сайтом Asn297. Гликозилирование в Asn297 либо сохраняли, либо удаляли в результате мутации. Мутации и желаемые результаты гликозилирования представлены в табл. 9.

Таблица 9

## Состояние гликозилирования различных вариантов антител

#	Мутация	Желаемый сайт гликозилирования	Применение
17	N297Q	Без гликозилирования (agly)	Контроль Agly
18	T299A	Без гликозилирования (agly)	Контроль Agly, неизвестная эффекторная функция
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	Без гликозилирования в 297, но со сконструированным сайтом гликозилирования в 298	Сниженная эффекторная функция; конъюгация через экспонированные группы сиаловой кислоты или галактозы
20	S298N/T299A/Y300S (STY)	Без гликозилирования в 297, но со сконструированным сайтом гликозилирования в 298	Сниженная эффекторная функция; конъюгация через экспонированные группы сиаловой кислоты или галактозы
21	S298N/Y300S (SY)	Два потенциальных сайта гликозилирования в 297 и 298; Изменения паттерна гликозилирования	Сниженная эффекторная функция; конъюгация через экспонированные группы сиаловой кислоты или галактозы
22	Дикий тип	297	Контроль

3А. Создание измененных вариантов гликозилирования антител H66 против  $\alpha\beta$ -TCR.

Мутации сделаны в тяжелой цепи клона антитела #66 против  $\alpha\beta$ -Т-клеточного рецептора с помощью QuikChange с использованием матрицы pENTR\_LIC\_IgG1. Домен VH HEBE1 Aab IgG1 #66 амплифицировали с праймерами LIC перед клонированием в мутантную pENTR\_LIC\_IgG1 или pENTR\_LIC\_IgG1 дикого типа с помощью LIC для создания полноразмерного мутанта или антитела дикого типа. Субклонирование проверяли двойным гидролизом с помощью DraIII/XhoI с получением вставки размером приблизительно 1250 п.о. у успешных клонов. Этих полноразмерных мутантов затем клонировали в экспрессионный вектор, pCER4 (-E+I)Dest, с помощью клонирования Gateway. Мутации подтверждали секвенированием ДНК. Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей WT H66 против  $\alpha\beta$ TCR и тяжелых цепей мутантного H66 приведены в табл. 10. Мутантные аминокислоты выделены серым цветом и консенсусные сайты-мишени гликозилирования, созданные с помощью мутации, подчеркнуты.

Таблица 10

Аминокислотные последовательности антител H66 против  $\alpha\beta$ TCR

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
23	Легкая цепь клона H66 против $\alpha\beta$ TCR	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWYQQ KPGQAPRRLLYDTSKLASGVPAREFSGSGSGTSYTLTIS SLEPEDFAVYYCQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIHPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
24	Тяжелая цепь клона H66 против $\alpha\beta$ TCR	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPNYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSTLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTSRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HTQKSLSLSPGK*
25	Тяжелая цепь клона H66 S298N/Y300S против $\alpha\beta$ TCR	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPNYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSTLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTSRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HTQKSLSLSPGK*
26	Тяжелая цепь клона H66 S298N/T299A/Y300S против $\alpha\beta$ TCR	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPNYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSTLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTSRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HTQKSLSLSPGK*
27	Тяжелая цепь клона H66 N297Q/S298N/Y300S против $\alpha\beta$ TCR	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPNYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSTLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTSRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HTQKSLSLSPGK*

Мутант, дикий тип и два конструкта не гликозилированных контролей (HEBE1 Agly IgG4 и HEBE1 Aab IgG1 в pCER4) трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в тройных флаконах для экспрессии. Белки очищали из 160 мл кондиционных сред (CM) с помощью 1 мл колонок протеина A HiTrap (GE) с использованием многоканального перистальтического насоса. 5 мкг каждого полученного в результате супернатанта анализировали на 4-20% трис-глициновом восстанавливающем и невосстанавливающем гелях SDS-PAGE (см. фиг. 2). Тяжелые цепи не гликозилированных мутантов (N297Q, T299A и контролей Agly) мигрировали дальше (острые стрелки), что согласуется с потерей гликанов у этих антител. Тяжелые цепи сконструированных гликозилированных антител (NSY, STY, SY, Aab и контроля WT, стрелки), однако, мигрировали сходно с контролем дикого типа. Этот результат согласуется с существованием сконструированного сайта гликозилирования в положении 298 по EU. Анализ SEC-ВЭЖХ показал, что все мутанты экспрессируются в виде мономеров.

### 3В. Анализ гликозилирования с помощью ЖХ-МС.

Сконструированные варианты Fc H66 IgG1 были частично восстановлены с помощью 20 mM DTT при 37°C в течение 30 мин. Затем образцы анализировали с помощью капиллярной ЖХ/МС в системе капиллярной ВЭЖХ Agilent 1100, соединенной с гибридной системой QSTAR qq TOF (Applied Biosystems). Для анализа данных использовали реконструкцию белков по Bayesian с базовой коррекцией и компьютерным моделированием в Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem). У мутанта антитела H66 S298N/T299A/Y300S выявлен один сайт гликозилирования в аминокислоте 298 с 2-антенарными и 3-антенарными гликанами сложного типа, обнаруженными в качестве основных видов наряду с G0F, G1F и G2F (см. фиг. 34). Этот измененный профиль гликозилирования согласуется со сдвигом гликозилирования на N298 вместо сайта гликозилирования дикого типа в N297.

3С. Связывающие свойства мутантов антитела против  $\alpha\beta$ TCR с Fc $\gamma$ RIIIa и Fc $\gamma$ RI человека с использованием Biacore.

Biacore использовали для оценки связывания с рекомбинантным человеческим Fc $\gamma$ RIIIa (V158 и F158) и Fc $\gamma$ RI. На всех четырех проточных ячейках на чипе CM5 иммобилизовывали антитела против HPC4 с помощью стандартной процедуры связывания амина, предоставленной Biacore. Антитела против HPC4 разводили до 50 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 5,0, для реакции присоединения и вводили в течение 25 мин при 5 мкл/мин. Приблизительно 12000 RU антител было иммобилизовано на поверхности чипа. Рекомбинантные Fc $\gamma$ RIIIa-V158 и Fc $\gamma$ RIIIa-F158 человека разводили до 0,6 мкг/мл в буфере для связывания (HBS-P с 1 mM CaCl<sub>2</sub>) и вводили в проточные ячейки 2 и 4 соответственно в течение 3 мин при 5 мкл/мин для захвата 300-400 RU рецептора на чипе против HPC4. Для выявления различий между слабо связывающими компонентами в три раза больше rhFc $\gamma$ RIIIa захватывалось на поверхности против HPC4 по сравнению с обычно используемым в данном анализе. Проточные ячейки 1 и 3 использовали в качестве референсных контролей. Каждое антитело разводили до 200 нМ в буфере для связывания и вводили через все четыре проточные ячейки в течение 4 мин с последующей 5-минутной диссоциацией в буфере. Поверхности регенерировали 10 mM ЭДТА в буфере HBS-EP в течение 3 мин при 20 мкл/мин. Результаты этих экспериментов показаны на фиг. 3.

Biacore был также использован для сравнения связывания Fc $\gamma$ RI. Проводили замену буфера антитела против тетра-His на 10 mM ацетат натрия, pH 4,0, используя колонку Zeba Desalting, и разводили до 25 мкг/мл в ацетатном буфере для связывания амина. На двух проточных ячейках чипа CM5 иммобилизовали ~9000 RU антитела против тетра-His после 20-минутной инъекции при 5 мкл/мин.

Как и в предыдущем эксперименте, в десять раз больше Fc $\gamma$ RI захватывалось на поверхности с антителами против тетра-His для сравнения образцов со слабым связыванием. Рекомбинантный Fc $\gamma$ RI человека разбавляли до 10 мкг/мл в буфере для связывания HBS-EP и вводили в проточную ячейку 2 в течение 1 мин при 5 мкл/мин для захвата ~1000 RU рецептора на чипе против тетра-His. Одну концентрацию антитела, 100 нМ, вводили в течение 3 мин при 30 мкл/мин через захваченный рецептор и контрольную поверхность. Затем прослеживали диссоциацию в течение 3 мин. Поверхность затем регенерировали двумя 30-секундными инъекциями 10 mM глицина, pH 2,5, при 20 мкл/мин. Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 4.

Эти результаты демонстрируют поразительное снижение связывания мутантов со сконструированным гликозилированием с Fc $\gamma$ RIIIa или Fc $\gamma$ RI. H66 S298N/T299A/Y300S, в частности, почти полностью прекращал связывание с обоими рецепторами. Этот мутант был выбран для более подробного анализа.

### 3D. Характеристика стабильности с помощью кругового дихроизма (CD).

Стабильность мутантного антитела S298N/T299A/Y300S прослеживали с помощью эксперимента по термическому плавлению Far-UV CD, в котором прослеживали сигнал CD при 216 и 222 нм в виде увеличивающейся температуры, приводящей к разрушению укладки антитела (денатурации).

Температуру контролировали с помощью термоэлектрической установки Пельтье (Jasco model AWC100) и увеличивали со скоростью 1°C/мин от 25 до 89°C. CD-спектры получали на спектрофотометре Jasco 815 при концентрации белка приблизительно 0,5 мг/мл в буфере PBS в кварцевой кювете (Hellma, Inc) с длиной пробега 10 мм. Скорость сканирования составляла 50 нм/мин и шаг данных 0,5 нм. Ширину полосы 2,5 нм использовали для настройки чувствительности среды. Сигнал CD и напряжение HT получали при 210-260 нм с интервалом данных 0,5 нм и при температурных интервалах 1°C и четыре повторных сканирования были выполнены для каждого образца. Результаты показывают, что как дельта-AB H66, так и мутант S298N/T299A/Y300S H66 проявляют сходное термическое поведение и имеют приблизительно одинаковую температуру начала деградации (приблизительно 63°C) (фиг. 35), дополнительно предполагая, что они имеют сравнимую стабильность.

### Пример 4. Функциональный анализ FC-сконструированных мутантов.

FC-сконструированных мутантов оценивали в тесте пролиферации PBMC и при анализе высвобождения цитокинов. В тесте пролиферации PBMC, PBMC человека культивировали с увеличивающимися концентрациями терапевтического антитела в течение 72 ч, добавляли <sup>3</sup>H-тимидин и клетки собирали через 18 ч. Для анализа уменьшения Т-клеток/высвобождения цитокинов PBMC человека культивировали с увеличивающимися концентрациями терапевтического антитела и анализировали ежедневно на ко-

личество и жизнеспособность клеток (Vi-cell, Beckman Coulter) до 7-го дня. Клеточные супернатанты также собирали, хранили при -20°C и анализировали на 8-компонентной панели цитокинов (Bio-Rad).

PBMC от нормального донора оттаивали и обрабатывали при следующих условиях (все в среде, содержащей комплемент):

необработанные;

BMA031, mIgG2b 10 мкг/мл;

ОКТ3, mIgG2a 10 мкг/мл;

H66, hulgG1 дельта-AB 10, 1 и 0,1 мкг/мл;

H66, hulgG1 S298N/T299A/Y300S 10, 1 и 0,1 мкг/мл.

Цитокины получали на 2-й день (D2) и 4-й день (D4) для анализа Bioplex (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). Клетки на D4 окрашивали на экспрессию CD4, CD8, CD25 и abTCR.

Результаты, представленные на фиг. 5-8, показывают, что H66 S298N/T299A/Y300S вел себя аналогично H66 дельта-AB во всех выполненных клеточных анализах, демонстрируя минимальную активацию Т-клеток путем экспрессии CD25, связывание с abTCR (со слегка отличающейся от дельта-AB кинетикой) и минимальное высвобождение цитокинов в оба момента времени D2 и D4. Мутант S298N/T299A/Y300S, таким образом, устраняет эффекторную функцию также эффективно, как и мутация дельта-AB.

Пример 5. Получение и характеристика сконструированного варианта Fc в каркасе антитела против CD-52.

В дополнение к антителу H66 против  $\alpha\beta$ TCR сконструирована также мутация S298N/Y300S в каркасе антитела против CD-52 (клон 2C3). Этот мутант затем исследовали для определения того, будет ли наблюдаемая модуляция эффекторной функции, выявленная в антителе H66 S298N/Y300S против  $\alpha$ TCR, совместима с работой в каркасе другого антитела.

5A. Создание антитела 2C3 против CD-52 с измененными вариантами гликозилирования.

Сначала получали вариант ДНК 2C3 S298N/Y300S с помощью набора Quick Change mutagenesis с использованием pENTR LIC IgG1 и VH 2C3 WT клонировали в мутантный вектор с помощью LIC. Полноразмерных мутантов клонировали в экспрессионный вектор pCEP4(-E+I)Dest с применением технологии Gateway. Мутации затем подтверждали секвенированием ДНК, и последовательности приведены в табл. 11. Мутанты затем трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в формате 6-луночного планшета и белок очищали из кондиционных сред. Антитело 2C3 дикого типа против CD-52 получали параллельно в качестве контроля. Уровень экспрессии, как установлено, составлял 0,1 мкг/мл при использовании анализа с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга (фиг. 9A). Экспрессию мутантов в чистых кондиционных средах также измеряли с помощью захвата белка протеином А на Biorad. Концентрацию определяли с помощью реакции диссоциации с иммобилизованным белком А после 6-минутной инъекции. Продуцируемое CHO антитело 2C3 WT серийно разводили в средах от 90 мкг/мл до 1,5 нг/мл и использовали в качестве стандартной кривой. Концентрации рассчитывали вплоть до приблизительно 0,2 мкг/мл с помощью калибровочной кривой с использованием 4-параметрической подгонки. Относительные уровни экспрессии были низкими и в целом согласовывались с данными Вестерн-блоттинга (фиг. 9).

Таблица 11

Последовательности клона 2C3 антител против CD-52

SEG ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
28	Легкая цепь 2C3 WT против CD-52	DIVMTQITPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCVQGTHTLHTFGQGTREIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVT HQLSPVTKSFNRGEC*
29	Тяжелая цепь 2C3 WT против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDVWGQGTFTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCAPPELLGGPSV FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	Тяжелая цепь 2C3 S298N/Y200S против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDVWGQGTFTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCAPPELLGGPSV FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

### 5B. Анализ гликозилирования с помощью PNG-азы F.

Для оценки дополнительных сайтов гликозилирования, введенных с помощью мутации, обогащенный S298N/Y300S мутант дегликозилировали с помощью PNG-азы F. Это не продемонстрировало какого-либо явного изменения молекулярной массы, что указывает на то, что никаких дополнительных углеводов не присутствовало (фиг. 10). Проводили получение в небольшом масштабе для того, чтобы очистить эти мутанты для дальнейшей характеристики, и результаты повторно подтвердили, что в мутанте S298N/Y300S не присутствует дополнительных углеводов (фиг. 11).

5C. Связывающие свойства мутантов антитела 2C3 против CD-52 с Fc $\gamma$ RIIIa человека с использованием Biacore.

Biacore также использовали для характеристики связывания антигена, Fc $\gamma$ RIII и связывающих свойств очищенных антител (фиг. 12-14). Вариант 2C3 S298N/Y300S прочно связан с пептидом CD-52, и связывающая сенсограмма была не отличима от контроля дикого типа, демонстрируя, что эта мутация не влияет на его связывание с антигеном (фиг. 12A).

Для анализа эффекторной функции Fc в исследованиях связывания использовали рецептор Fc $\gamma$ RIII (Val158). Мутантное и контрольное антитело дикого типа разбавляли до 200 нМ и вводили в HPC4-тег с захваченным Fc $\gamma$ RIIIa. Связывание Fc $\gamma$ RIII было почти невозможно обнаружить в случае мутанта S298N/Y300S, что указывает на потерю эффекторной функции этим вариантом (фиг. 12B и 14A). Для дальнейшего анализа эффекторной функции Fc рецептор Fc $\gamma$ RIII (Phe158) также использовали в исследованиях связывания. Мутантное антитело и контрольное антитело дикого типа разбавляли до 200 нМ и вводили в HPC4-тег с захваченным Fc $\gamma$ RIIIa. Связывание Fc $\gamma$ RIII было почти невозможно обнаружить в случае мутанта S298N/Y300S, что указывает на потерю эффекторной функции варианта Phe158 (фиг. 14B). Наконец, Biacore использовали для сравнения связывающих FcRn свойств очищенных белков. FcRn-HPC4 мыши и очищенный SEC FcRn-HPC4 человека иммобилизовывали на чипе CM5 через соединение с амином. Каждое антитело разводили до 200, 50 и 10 нМ и вводили поверх рецепторов. Campath, продуцируемые CHO 2C3 WT, и DEPC-обработанные Campath включали в качестве положительных и отрицательных контролей. Эти данные показывают, что мутант связывает рецептор FcRn как человека, так и мыши с тем же сродством, что и контрольные антитела дикого типа, и что он, скорее всего, не имеет каких-либо изменений в его периоде полужизни в кровотоке или в других фармакокинетических свойствах (см. фиг. 12C, 13A и 13B). Соответственно, мутация S298N/Y300S применима к антителам в целом для снижения или устранения нежелательной эффекторной функции Fc, например, посредством взаимодействия с рецепторами Fc $\gamma$  человека.

### Пример 6. Определение циркулирующих иммунных комплексов мутанта S298N/Y300S.

Проводили также определение циркулирующих иммунных комплексов с помощью анализа связывания Clq мутантом S298N/Y300S и контрольным WT. Сильно связывающие 96-луночные планшеты Costar покрывали в течение ночи при 4°C 100 мкл 2-кратных серийных разведений Ab 2C3 в концентрациях в диапазоне от 10 до 0,001 мкг/мл в буфере для покрытия (0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,2). Анализ ELISA показал, что связывание Clq мутантом S298N/Y300S уменьшается по сравнению с WT (фиг. 15A). Связывание Ab против Fab к покрытым Ab 2C3 подтвердили эквивалентное покрытие лунок (фиг. 15B).

### Пример 7. Разделение и анализ мутанта S298N/Y300S с использованием методов изоэлектрофокусирования.

Изоэлектрическое фокусирование (IEF), pH 3-10, проводили с целью характеристики мутантов S298N/Y300S. S298N/Y300S, как установлено, имел больше отрицательных зарядов и, следовательно, вероятно, больше молекул сиаловой кислоты (фиг. 18A). Как мутант S298N/Y300S, так и WT 2C3, как показано с помощью интактной MC, имели G0F и G1F в качестве доминирующих видов гликозилирования (фиг. 18B и D соответственно).

### Пример 8. Антигенсвязывающее сродство S298N/Y300S.

Biacore использовали для сравнения антигенсвязывающего сродства Ab 2C3 WT против CD-52 и мутанта S298N/Y300S, который был получен и очищен как в небольших (фиг. 16), так и в больших масштабах (фиг. 17) экспрессии. Получали чипы CM5 с иммобилизованным пептидом 741 CD-52 и контрольным пептидом 777. Антитела серийно разводили в 2 раза от 60 до 0,2 нМ в HBS-EP и затем вводили поверх поверхности чипа в течение 3 мин с последующей диссоциацией в течение 5 мин в буфере при скорости потока 50 мкл/мин. Поверхность затем регенерировали 1 пульсом 40 мМ HCl. Эти исследования выполняли в двух параллелях, и они продемонстрировали, что мутант S298N/Y300S и антитела 2C3 WT демонстрируют сравнимое связывание пептида CD-52.

Для проверки функциональных связывающих свойств перед очисткой, направленной на скрининг антител, созданных при трансфекциях в небольшом масштабе, разработали платформу скрининга сред. Эти тесты проводили с использованием Octet (фиг. 19A) для определения концентрации и с использованием биосенсоров на основе протеина A и стандартной кривой GLD52. Образцы разводили до 7,5 и 2 нМ в HBS-EP для сравнения связывания CD-52 с использованием Biacore (фиг. 19B). Результаты тестирования связывания пептида показали, что как мутант S298N/Y300S, так и антитело 2C3 WT характеризуются сравнимым связыванием пептида CD-52. Кроме того, эти анализы показывают, что Octet и Biacore хоро-

шо работают в отношении предсказания связывания антигена с антителами при трансфекциях в небольшом масштабе.

Пример 9. Получение мутантов S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S и N297Q/S298N/Y300S с измененным гликозилированием в каркасах дополнительных антител.

В дополнение к антителу против  $\alpha\beta$ -TCR и антителу 2C3 против CD-52 были сконструированы мутации S298/Y300S, S298N/T299A/Y300S и N297Q/S298N/Y300S в каркасах других антител для подтверждения того, что дополнительный tandemный сайт гликозилирования может быть введен в неродственные последовательности вариабельных доменов тяжелых цепей. Мутанты 12G6 против CD-52 и мутанты против Her-2 с альтернативным гликозилированием представлены в табл. 12 и 13.

Таблица 12

## Последовательности клона 12G6 антител против CD-52

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
31	Легкая цепь 12G6 WT против CD-52	DIVMTQTPLSLSVTPGGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNNV LQKPGQSPQRLIYLVSCLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCVQGSHTFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
32	Тяжелая цепь 12G6 WT против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
33	Тяжелая цепь 12G6 S298N/Y300S против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
34	Тяжелая цепь 12G6 S298N/T299A/Y300S против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
35	Тяжелая цепь 12G6 N297Q/S298N/Y300S против CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*

Таблица 13

## Последовательности антитела против Her2

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
36	Легкая цепь WT против Her2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTTCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGEC*
37	Тяжелая цепь WT против Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWWGGDFYAMDYWGQGLTLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
38	Тяжелая цепь антитела S298N/T299A/Y300S против Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWWGGDFYAMDYWGQGLTLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

Пример 10. Создание измененных антител, содержащих реакционноспособные части гликанов.

Для создания антител, содержащих части гликанов, способные вступать в реакцию с дериватизированными эффекторными фрагментами, антитело против HER сначала гликозилировали *in vitro* с использованием гликозилтрансферазы и соответствующих доноров УДФ-сахаров. Например, для введения остатков сиаловой кислоты донорские антитела сначала галактозилировали с помощью  $\beta$ -галактозилтрансферазы, затем сиалилировали с помощью  $\alpha$ 2,6-сиалилтрансферазы в соответствии с методами 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). Реакцию осуществляли при стадии синтеза в одном реакционном сосуде с использованием  $\beta$ -галактозилтрансферазы (50 мЕ/мг, Sigma) и  $\alpha$ 2,6-сиалилтрансферазы (5 мкг/мг, R&D system) с субстратами-донорами сахаров нуклеотидов, УДФ-галактозой (10 мМ) и CMP-сиаловой кислотой (10 мМ) в 50 мМ MES буфере (pH 6,5), содержащем 5 мМ  $MnCl_2$ . Реакционную смесь, содержащую 5 мг/мл антитела против Her2, инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Сиалилирование подтверждали с помощью анализа MALDI-TOF MS предварительно метилированных гликанов, высвобождаемых из антитела под действием PNG-азы F, анализа содержания сиаловой кислоты с использованием ВЭЖХ Dionex и блоттинга лектина с SNA, лектина, специфичного для  $\alpha$ 2,6-сиаловой кислоты.

MALDI-TOF анализ гликанов, высвобождаемых с помощью обработки PNG-азой сиалилированного антитела против Her2, показал, что нативные гликаны полностью ремоделированы главным образом в моносиалилированную 2-антенарную структуру, A1F (фиг. 27A), совместно с небольшим количеством дисиалилированных видов. Обработка антитела более высокими количествами  $\alpha$ 2,6-сиалилтрансферазы дала более гомогенные популяции гликоформы A1F, что предполагает, что либо активность фермента, либо локализация гликанов может препятствовать полному сиалилированию. Содержание сиаловой кислоты определено как составляющее ~2 моль на 1 моль антитела, что совпадает с гликаном A1F как основным видом гликоформы (фиг. 27B). Блоттинг лектина с лектином SAN, Sambucus nigra agglutinin, специфичного для  $\alpha$ 2,6-связанной сиаловой кислоты, подтвердил, что сиаловая кислота присутствовала в конфигурации  $\alpha$ 2,6-связи (фиг. 27C).

В заключение, что, хотя гликаны нативного белка в некоторой степени гетерогенны, ремоделирование с помощью галактозил- и сиалилтрансфераз дает примерно гомогенное антитело с моносиалилированными, но полностью галактозилированными 2-антенарными гликанами (A1F). Введение только примерно одной сиаловой кислоты на два акцептора галактозы в каждом разветвленном гликане может быть обусловлено ограниченной доступностью одной из галактоз гликанов, которая часто скрыта в антителе, или нековалентными взаимодействиями гликанов с поверхностью белка.

Пример 11. Окисление измененных антител, содержащих реакционноспособные части гликанов.

После подтверждения сиаилирования исследовали процесс окисления сиаилированного антитела против Her2 различными концентрациями периодата (от 0,25 до 2 мМ). Сначала проводили обмен буфера сиаилированного антитела на 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), содержащий 5 мМ ЭДТА с последующей заменой буфера на буфер PBS. Смесь забуференных антител затем наносили на колонку протеин А-Сефарозы, предварительно уравновешенную буфером PBS. Затем колонку промывали PBS в объеме 15 колонок, PBS в объеме 15 колонок, содержащем 5 мМ ЭДТА, и PBS в объеме 30 колонок, затем их элюировали 25 мМ цитрат-фосфатным буфером (pH 2,9). Элюаты немедленно нейтрализовали двухосновным фосфатным буфером и антитела концентрировали с использованием Amicon ultra от Millipore. После очистки сиаилированное антитело против Her2 затем окисляли периодатом натрия (Sigma) в 100 мМ натрий ацетатного буфера (pH 5,6) на льду в темноте в течение 30 мин и реакцию гасили 3% глицерином на льду в течение 15 мин. Продукт обессоливали и проводили замену буфера на 100 мМ натрий ацетатный буфер (pH 5,6) путем 5 циклов ультрацентрифугирования через Amicon 50 кДа. На фиг. 28А показан анализ содержания сиаловой кислоты сиаилированного антитела, протитрованного различными количествами периодата. Полное окисление остатков сиаловой кислоты достигалось при концентрации периодата 0,5 мМ. Действительно, настолько низкая концентрация периодата как 0,5 мМ достаточна для полного окисления введенной сиаловой кислоты. Соответственно, концентрация 1 мМ периодата была выбрана для окисления сиаилированного антитела для конъюгации с лекарством.

Окисление может оказывать неблагоприятные эффекты на целостность антитела. Например, окисление остатков метионина, включая Met-252 и Met-428, локализованных в области CH3 Fc в непосредственной близости к сайту связывания FcRn, как известно, влияет на связывание FcRn, которое является решающим для продления периода полужизни антитела в сыворотке (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). Соответственно, была проведена проверка потенциальных побочных эффектов окисления периодатом на остатках метионина (например, Met-252), решающих для взаимодействия с FcRn сиаилированного антитела в окисленном состоянии, при определении с помощью анализа ЖХ/МС пептидов после гидролиза трипсином. Этот анализ выявил ~30% окисления Met-252 и <10% окисления Met-428 после обработки сиаилированного трастузумаба 1 мМ периодатом. Для определения вклада этой степени окисления метионина в связывание FcRn оценивали кинетику связывания FcRn каждым антителом с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore). Это анализ выявил, что окисленное состояние коррелировало с минорной потерей связывания FcRn (снижение  $K_a$  на 12 и 26% для FcRn мыши и человека, см. фиг. 28В и С соответственно). Следует отметить, что ~25% снижение  $K_a$  для FcRn человека, как сообщалось, не влияет на период полужизни в сыворотке у трансгенной мыши с FcRn человека, так как один интактный сайт FcRn на каждом антителе достаточен для обеспечения функционирования и преимущества PK (Wang et al., там же).

Таким образом, эти данные показывают, что введение чувствительных к периодату остатков сиаловой кислоты с помощью обработки сиаилтрансферазой позволяет использовать намного более низкие концентрации периодата, что приводит к минимальным побочным эффектам при взаимодействиях антитело-FcRn и целостности антитела при оценке по агрегации (<1%). Таким образом, применение сиаилированных антител в соответствии со способами по изобретению предоставляет более широкое окно для применяемых условий окисления, позволяя создавать воспроизводимую генерацию активных гликоконъюгатов, не влияя на период их полужизни в сыворотке.

Галактоза в гипергликозилированном мутантном антителе также может быть окислена конкретно при использовании галактооксидазы для создания альдегидной группы для конъюгации. Для подтверждения этого подхода антитело A114N против TEM1 концентрировали до 13-20 мг/мл и затем обрабатывали 20 мЕ/мг сиалидазой в PBS в течение 6 ч при 37°C. Десиаилированный продукт затем окисляли галактооксидазой ("GAO"), сначала 5 мкг GAO/мг белка в течение ночи при 37°C с последующим добавлением 2 мкг GAO/мг белка и инкубацией в течение дополнительных 5 ч. Ацетат натрия добавляли для доведения pH до 5,6 (0,1 об./об., pH 5,6) и DMSO добавляли для достижения конечной концентрации реакционной смеси 16% перед конъюгацией. Гипергликозилированное мутантное антитело A114N против HER (15 мг/мл) десиаилировали сходным образом с помощью сиалидазы (20 мЕ/мг) и окисляли с помощью 5 мкг GAO на мг белка в одиночной реакции в течение ночи при 37°C.

Пример 12. Синтез реакционноспособных эффекторных частей.

Для того чтобы облегчить конъюгацию с дериватизированными альдегидом гликоформами антител по изобретению, кандидатные эффекторные части лекарства (например, монометилауристатина Е (ММАЕ) и доластатина 10 (Dol10) дериватизировали аминоксистиамидом для включения функциональных групп (например, аминоксисти-сис), специфически реагирующих с альдегидом.

Вкратце, для получения аминоксистиамида в качестве исходного вещества S-третил-L-цистеинамид (362 мг, 1 ммоль) добавляли к 3 мл DMF раствора N-гидроксисукцинимидного сложного эфира трет-ВOC-аминоксисуксусной кислоты (289 мг, 1 ммоль). Реакция завершалась через 3 ч, о чем свидетельствовал анализ ВЭЖХ. Реакционную смесь затем разводили 30 мл дихлорметана и промывали

0,1 М бикарбонатом натрия (2×20 мл), водой (2×20 мл) и соевым раствором (2×20 мл). Раствор сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали досуха. К этому сухому остатку добавляли 3 мл TFA и затем 150 мкл триэтилсилана. Полученный раствор осаждали из трет-бутилметилового эфира и процесс повторяли три раза. После фильтрации остаток сушили при пониженном давлении с получением 250 мг не совсем белого твердого вещества (выход 67%). Соединение использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Для получения аминокси-derivатизированного MMAE (аминокси-цис-MC-VC-PABC-MMAE) 30,1 мг аминоксистиамида (0,098 ммоль, 2 экв.) объединяли с 64,6 мг MC-VC-PABC-MMAE (0,049 ммоль) и 100 мкл триэтиламина в 3 мл DMF. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин, за это время реакция завершалась, судя по анализу ВЭЖХ. Соединение очищали препаративной ВЭЖХ с выходом 45 мг (62%) желаемого продукта в виде не совсем белого твердого вещества. Анализ ВЭЖХ с обращенной фазой предполагал чистоту соединения >96%.

ESI рассчитано для  $C_{73}H_{116}N_{14}O_{18}S$  (MH)<sup>+</sup> 1509,8501; найдено, m/z 1509,8469.

Для получения аминокси-derivатизированного Dol10 (аминокси-4HC-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10) 7,4 мг (0,024 ммоль, 3 экв.) аминоксистиамида, 12 мг (0,008 ммоль) MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 и 30 мкл триэтиламина объединяли в 3 мл DMF. Реакция завершалась через 15 мин, судя по анализу ВЭЖХ. При очистке препаративной ВЭЖХ получено 6,2 мг (46%) желаемого продукта в виде не совсем белого твердого вещества. Анализ ВЭЖХ с обращенной фазой предполагал чистоту соединения >96%.

ESI рассчитано для  $C_{80}H_{124}N_{16}O_{19}S_2$  (MH)<sup>+</sup> 1678,0664; найдено, m/z 1678,0613.

Пример 13. Конъюгация реакционноспособных эффекторных частей, опосредуемая сиаловой кислотой (SAM).

После обессоливания лекарства-линкеры из примера 11 объединяли с окисленными сиалированными антителами из примера 10 в 75% DMSO в концентрации 25 мМ до достижения молярного отношения лекарства-линкера к антителу 24:1 и конечной концентрации антитела 5 мг/мл. Смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Не включенные лекарства-линкеры и свободные лекарства удаляли с использованием BioBeads. Проводили замену буфера продукта на гистидин-Твин-буфер с использованием колонок PD-10 и стерильной фильтрации. Определяли уровни эндотоксинов, и они достигали менее 0,1 EU/мг при исследовании *in vivo*.

На фиг. 29A-C показаны хроматограммы гидрофобного взаимодействия (HIC) различных сиалированных антител (B11 и G11 против FAP и антитела против Her2 из примера 11), гликоконъюгированных с АО-MMAE. Сиалированное антитело против Her2 также конъюгировали с лекарством-линкером, АО-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (фиг. 29D). Этот анализ выявляет наличие главным образом одного или двух конъюгатов лекарства на антитело с отношением лекарства к антителу (DAR) в диапазоне от 1,3 до 1,9. Повышение времени задержки гликоконъюгата Dol10 (фиг. 29D) по сравнению с гликоконъюгатом MMAE (фиг. 29C), вероятно, обусловлено более высокой гидрофобностью Dol10.

Проводили также анализ ЖХ-MC с антителом против HER, конъюгированным с двумя различными лекарствами-линкерами (АО-MMAE или АО-PEG8-Dol10) в масштабе 30 мг. Этот анализ показал сходные величины DAR 1,7 и 1,5 после конъюгации, что сравнимо с анализом HIC. Исключающая по размеру хроматография (SEC) показала очень низкие уровни (1%) агрегатов у этих конъюгатов.

Пример 14. Конъюгация реакционноспособных эффекторных частей, опосредуемая галактозой (GAM).

Альдегид галактозы, образованный с помощью галактооксидазы на A114N гипергликозилированного мутантного антитела против TEM1, как описано в примере 11, конъюгировали с 24 молярным избытком аминокси-MC-VC-PABC-MMAE лекарства-линкера через антитело путем ночной инкубации при 25°C с получением конъюгата ADC с величиной DAR 1,72.

К антителу против HER, обработанному галактооксидазой, полученному как описано в примере 11, добавляли 1/10 реакционного объема 1 М ацетата натрия, pH 5,6, с доведением pH до 5,6 и добавляли DMSO с созданием конечной концентрации 14% перед добавлением 24 экв. аминокси-MC-VC-PABC-MMAE лекарства-линкера. Реакционные смеси инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Свободное лекарство и лекарство-линкер очищали с помощью Biobeads и у продукта проводили смену буфера на SEC (выход 65%). Как показано на фиг. 30, АО-MMAE конъюгировался с ~60% молекул.

Пример 15. Тестирование влияния ADC на клеточную пролиферацию *in vitro*.

Активность молекул гликоконъюгатов против HER и против FAP по изобретению *in vitro* сравнивали также с соответствующими тиоловыми конъюгатами, содержащими ту же самую лекарственную часть, связанную через тиоловые связи с цистеинами области шарнира того же донорского антитела. Тиоловые конъюгаты содержали приблизительно в два раза большее количество лекарства на антитело (DAR), чем гликоконъюгаты. Конъюгацию на основе тиолов осуществляли, как описано Stefano et al. (Methods in Molecular Biology, 2013, в печати). Затем использовали клеточные линии Her2+ SK-BR-3 и Her2- MDA-MB-231 для оценки относительной эффективности каждого ADC. Результаты этого анализа

представлены в табл. 14.

Таблица 14

Сравнение  $EC_{50}$  гликоконъюгатов и тиоловых конъюгатов

	DAR	$EC_{50}$ (нг/мл)
MC-VC-PABC-MMAE против HER (тиол-MMAE)	3,8*	2,3
АО-Cys-MC-VC-PABC-MMAE против HER (глико-MMAE)	1,7*	4,7
MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 против HER (тиол-Dol10)	3,9*	0,45
АО-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 против HER (глико-Dol10)	1,5*	0,97
B11-MC-VC-PABC-MMAE против FAP (тиол-MMAE), CHO+FAP	3,3**	382,4
B11-АО-Cys-MC-VC-PABC-MMAE против FAP (глико-MMAE), CHO+FAP	1,5**	682,4

\*DAR определяли с помощью ЖХ-МС;

\*\*DAR определяли с помощью HIC.

На фиг. 31 показано сравнение эффективности *in vitro* гликоконъюгата против HER и его аналога тиолового конъюгата. Жизнеспособность клеток определяли после экспозиции конъюгатов в течение 72 ч с клетками (SK-BR-3), экспрессирующими антиген Her-2 (фиг. 31А и С) или не экспрессирующими его клетками (MDA-MB-231) (фиг. 31В и 31D). ADC, содержащие либо MMAE, либо PEG8-Dol10, соединяли с гликанами ("глико") или с цистеинами области шарнира с помощью традиционных химических методов ("тиолы"). Как показано на фиг. 30А и 30С, примерно в 2 раза более низкая  $EC_{50}$  выявлена для тиоловых конъюгатов по сравнению с гликоконъюгатами, что соответствует в 2 раза более высокому DAR у первых по сравнению с последними. Никакой токсичности любого антитела при концентрации до 100 мкг/мл не было обнаружено для клеточной линии Her-2-.

Сходные тенденции наблюдались также в отношении клеточной пролиферации для ADC, полученных с антителами против опухолевого антигена (FAP), который интенсивно экспрессируется реактивными фибробластами стромы при эпителиальных типах рака, включая рак ободочной кишки, поджелудочной железы и молочной железы (Teicher, B.A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets, 9, 982-1004). Эти конъюгаты опять получали путем конъюгации либо аминоксид-ММАЕ лекарства-линкера, либо малеимида-ММАЕ лекарства-линкера с гликанами или тиоловой группой. Тесты по влиянию этих конъюгатов на клеточную пролиферацию показали, что  $EC_{50}$  тиолового конъюгата характеризовалась на клетках CHO, трансфицированных FAP человека, примерно в 100 раз более высокой эффективностью, чем на тех же клетках, не экспрессирующих FAP, как изображено на фиг. 32, на которой показано сравнение эффективности *in vitro* гликоконъюгата B11 против FAP и тиолового конъюгата. Определяли выживаемость клеток после экспозиции конъюгатов с клетками CHO, трансфицированными или не трансфицированными антигеном FAP. ADC содержали MMAE, соединенный с гликанами ("глико") или с цистеинами области шарнира с помощью традиционных химических методов ("тиол"). Следует отметить, что примерно в 2 раза более низкая  $EC_{50}$  для тиола по сравнению с гликоконъюгатами соответствует относительным количествам доставляемого лекарства на антитело, предполагая сходную эффективность связывания мишени и интернализации в экспрессирующие антиген клетки CHO. Параллельно оценивали гликоконъюгат ADC против FAP (B11) с DAR 1,5, как описано выше, и выявили примерно в 2 раза более высокую  $EC_{50}$  по сравнению с тиоловым конъюгатом (DAR 3,3).

Как показано на фиг. 36, сходные тенденции наблюдались в отношении анализа клеточной пролиферации для ADC, полученного с антителом против HER, несущим гипергликозилирующую мутацию A114N, и АО-MMAE, как описано в примере 14, при анализе на клетках, экспрессирующих SK-BR-3, или клетках MDA-MB-231. Гликоконъюгат A114N четко продемонстрировал увеличенную клеточную токсичность в отношении клеточной линии, экспрессирующей Her-2, относительно не экспрессирующей его линии. Относительная токсичность по сравнению с гликоконъюгатом SialT, полученным с тем же антителом, соответствует более низкой нагрузке лекарством в этом препарате.

Анализ влияния на клеточную пролиферацию был также осуществлен для ADC, полученного с антителом против TEM1, несущим гипергликозилирующую мутацию A114N, и АО-MMAE, полученным, как описано в примере 14. Более высокая токсичность наблюдалась в клеточных линиях SJSA-1 и A673, экспрессирующих TEM1, по сравнению с линией MDA-MB-231, не экспрессирующей его. Уровень токсичности по сравнению с традиционным тиоловым конъюгатом с тем же антителом соответствовал нагрузке лекарством (DAR) в этом препарате.

	SJSA-1	A673- RPMI	A673- DMEM-RPMI	MDA-MB- 231
	IC50	IC50	IC50	IC50
A114N-AO-MC-VC-PABC- MMAE против TEM1	3 мкг/мл	3,2 мкг/мл	2,2 мкг/мл	40 мкг/мл
MC-VC-PABC-MMAE против TEM1	4 мкг/мл	1 мкг/мл	0,9 мкг/мл	20 мкг/мл

Заключается, что сайт-специфическая конъюгация лекарств через гликаны с расщепляемыми линкерами дает ADC с токсичностью и эффективностью *in vitro*, которые эквивалентны традиционным конъюгатам на основе тиолов, как показано с помощью различных антител и различных лекарств-линкеров. Более того, при концентрации периодата ниже 2 мМ уровень конъюгации лекарства коррелирует с восстановлением сиаловой кислоты. Повышение концентрации периодата выше 2 мМ дает небольшое преимущество из-за ожидания полного превращения сиаловой кислоты в окисленную форму. Однако при всех условиях количество молекул лекарства на антитело слегка ниже, чем количество сиаловой кислоты, указывая на то, что некоторое количество окисленных сиаловых кислот может быть также недоступно для присоединения, либо из-за их скрытости, либо из-за обусловленного иным образом стерического препятствия, возникающего из-за величины лекарства-линкера.

Пример 16. Характеристика конъюгатов антитело-лекарство *in vivo*.

Эффективность гликоконъюгатов против HER оценивали также в модели ксенотрансплантатов опухолевых клеток Her-2+ и сравнивали с тиоловыми конъюгатами как веществами сравнения, имеющими примерно в 2 раза более высокое DAR. Мышам Beige/SCID имплантировали опухолевые клетки SK-OV-3 Her-2+, которым позволяли достигать размеров опухоли ~150 мм<sup>3</sup> перед началом лечения. ADC в дозах 3 или 10 мг/кг вводили в хвостовую вену на 38, 45, 52 и 59 день. Использовали ~10 мышей на группу. Измеряли объем опухолей у мышей разных групп и записывали их выживаемость. Кривые выживаемости строили по методу Каплана-Мейера.

На фиг. 33 показано сравнение эффективности *in vivo* гликоконъюгатов против HER и тиоловых конъюгатов в модели ксенотрансплантатов опухолевых клеток Her-2+. Мышам Beige/SCID с имплантированными опухолевыми клетками SK-OV-3 Her-2+ вводили дозы MMAE (фиг. 33A и B) и PEG8-Dol10 (фиг. 33C и D), содержащие гликоконъюгаты или тиоловые конъюгаты в качестве веществ сравнения, имеющих примерно в 2 раза более высокое DAR. Кинетика роста опухолей конъюгатов с MMAE показана на фиг. 33A. В этом случае гликоконъюгат показал существенно более высокую эффективность по сравнению с одним чистым антителом (черные), но меньшую, чем тиоловый конъюгат в качестве вещества сравнения, имеющий примерно в 2 раза более высокое DAR (зеленый). Гликоконъюгат с MMAE показал существенную регрессию опухолей и ~20-дневную задержку роста опухолей (фиг. 33A) и ~2-кратное повышение времени выживаемости от первой дозы (фиг. 33B). Тиоловый конъюгат с MMAE показал почти полное подавление опухоли в той же дозе ADC (10 мг/кг).

Определяли также эффективность *in vivo* гликоконъюгата PEG8-Dol10 ("глико Dol10") и тиолового конъюгата в качестве вещества сравнения с примерно в 2 раза более высоким DAR ("тиол Dol10") в той же самой модели ксенотрансплантатов опухолевых клеток Her-2+. Оба конъюгата продемонстрировали более низкую эффективность, чем конъюгаты с MMAE, как описано выше. Однако гликоконъюгат аминокси-PEG8-Dol10 ("глико Dol10") в дозе 10 мг/кг продемонстрировал 15-дневную задержку роста опухолей (фиг. 33C) и ~20-дневное повышение времени выживаемости после первого введения (фиг. 33D). Тиоловый конъюгат был более эффективным в той же дозе, демонстрируя 2-кратное повышение выживаемости. В более низкой дозе (3 мг/кг) тиоловый конъюгат продемонстрировал меньшую эффективность, чем гликоконъюгат в дозе 10 мг/кг. Эта доза соответствует дозе 80 мкмоль лекарства PEG8-Dol10 на 1 кг по сравнению с дозой 110 мкмоль лекарства PEG8-Dol10 на 1 кг для гликоконъюгата.

Эти данные показывают, что сайт-специфическая конъюгация лекарств с сиаловой кислотой гликанов антитела дает молекулы с эффективностью, сравнимой с ADC, получаемых химически на основе тиолов. Несколько более низкая эффективность *in vivo* очевидно происходит из-за меньшего количества лекарства, которое несет каждое антитело в опухолевые клетки в результате интернализации каждого антигена, связанного с антителом. Хотя авторы не сравнивали эти гликоконъюгаты с тиоловыми конъюгатами с тем же DAR, наблюдаемая эффективность при различных дозах двух ADC, предоставляющих сравнимые уровни вводимого лекарства, показывает, что гликоконъюгаты имеют присущую им эффективность, сравнимую с их тиоловыми аналогами, показывая отсутствие вредного влияния конъюгации в этом сайте. Более того, доза 10 мг/кг гликоконъюгата Dol10, при которой вводится только на 28% больше лекарства, давала 2-кратное повышение выживаемости по сравнению с тиоловым конъюгатом (в дозе 3 мг/кг), предполагая, что эти конъюгаты могут даже обеспечить лучшую эффективность при том же DAR. При представленном кажущемся ограничении во включении сиаловой кислоты в нативные гликаны более высокая нагрузка лекарством может быть достигнута с помощью различных стратегий, включая использование разветвленных линкеров лекарств или введение дополнительных сайтов гликозилирования.

вания и использование такого же способа.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или иммуноадгезин, включающий домен Fc IgG1 с измененным гликозилированием, причем домен Fc включает остаток аспарагина в положении 298 и остаток серина или треонина в положении 300 в соответствии с нумерацией EU, причем антитело или иммуноадгезин обладают сниженной связывающей аффинностью к рецептору FcγRI и/или FcγRIIIa по сравнению с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.
2. Антитело или иммуноадгезин по п.1, дополнительно включающий остаток аланина в положении 299 в соответствии с нумерацией EU.
3. Антитело или иммуноадгезин по п.1, дополнительно включающий остаток глутамина в положении 297 в соответствии с нумерацией EU.
4. Антитело или иммуноадгезин по любому из предшествующих пунктов, где домен Fc является Fc человека.
5. Антитело или иммуноадгезин по любому из предшествующих пунктов, где боковая цепь остатка аспарагина в положении 298 связана с гликаном через β-гликозиламидную связь.
6. Антитело или иммуноадгезин по п.5, где гликан представляет собой биантенарный гликан.
7. Антитело или иммуноадгезин по п.5 или 6, где гликан имеет природную гликоформу млекопитающих.
8. Антитело или иммуноадгезин по любому из предшествующих пунктов, который имеет сродство к рецептору FcRn, сходное с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.
9. Антитело или иммуноадгезин по любому из пп.5-8, где гликан включает реакционноспособную альдегидную группу.
10. Антитело или иммуноадгезин по любому из пп.5-8, где гликан включает окисленный остаток сахара, включающий реакционноспособную альдегидную группу.
11. Антитело или иммуноадгезин по п.10, где окисленный остаток сахара представляет собой концевую сиаловую кислоту или галактозу.
12. Антитело или иммуноадгезин по любому из пп.5-8, где гликан связан с эффекторной частью, которая представляет собой цитотоксин.
13. Антитело или иммуноадгезин по п.12, где цитотоксин представляет собой монометилауристатин E и доластатин 10.
14. Антитело или иммуноадгезин по п.12, где эффекторная часть связана через оксимную или гидразонную связь с остатком сахара гликана.
15. Антитело или иммуноадгезин по п.14, где остаток сахара представляет собой концевую сиаловую кислоту или остаток галактозы гликана.
16. Антитело или иммуноадгезин по п.12, где эффекторная часть включает pH-чувствительный линкер, дисульфидный линкер, чувствительный к ферменту линкер или другую расщепляемую линкерную часть.
17. Антитело или иммуноадгезин по п.12, где эффекторная часть включает линкерную часть, выбранную из группы, состоящей из компонента, происходящего из цистеинамида, компонента, происходящего из малеимида, компонента, происходящего из валина, соединенного с цитрулином, и компонента, происходящего из 4-аминобензилкарбамата.
18. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или иммуноадгезин по любому из пп.1-4.
19. Вектор экспрессии, включающий полинуклеотид по п.18.
20. Клетка-хозяин для продукции антитела или иммуноадгезина, включающая полинуклеотид по п.18 или вектор по п.19.
21. Способ получения антитела или иммуноадгезина, включающий экспрессию полинуклеотида по п.18 или вектора по п.19 в клетке-хозяине.
22. Иммуноадгезин по п.1, который дополнительно включает связывающую область не антитела, которая представляет собой рецептор или лиганд рецептора.
23. Иммуноадгезин по п.22, где связывающая область не антитела представляет собой рецептор.
24. Иммуноадгезин по п.22, где связывающая область не антитела представляет собой лиганд рецептора.
25. Антитело или иммуноадгезин по п.1, где по меньшей мере один мишеневый связывающий сайт антитела или иммуноадгезина содержит лигандсвязывающий сайт рецептора.
26. Антитело или иммуноадгезин по п.1, где по меньшей мере один мишеневый связывающий сайт антитела или иммуноадгезина содержит связывающий рецептор сайт лиганда.
27. Выделенное антитело или иммуноадгезин, включающий домен Fc IgG1 человека с измененным гликозилированием, причем домен Fc содержит остаток аспарагина в положении 297;

остаток гликозилированного аспарагина в положении 298;  
аминокислоту в положении 299, которая не является пролином; и  
остаток серина или треонина в положении 300 в соответствии с нумерацией EU,  
причем антитело или иммуноадгезин обладают сниженной связывающей аффинностью к рецептору FcγRI и/или FcγRIIIa по сравнению с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.

28. Выделенное антитело или иммуноадгезин, включающий домен Fc IgG1 человека с измененным гликозилированием, причем домен Fc содержит  
остаток глутамина в положении 297;  
остаток гликозилированного аспарагина в положении 298;  
аминокислоту в положении 299, которая не является пролином; и  
остаток серина или треонина в положении 300 в соответствии с нумерацией EU,  
причем антитело или иммуноадгезин обладают сниженной связывающей аффинностью к рецептору FcγRI и/или FcγRIIIa по сравнению с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.

29. Выделенное антитело или иммуноадгезин, включающий домен Fc IgG1 человека с измененным гликозилированием, причем домен Fc содержит

- остаток аспарагина в положении 297;
- остаток гликозилированного аспарагина в положении 298;
- остаток аланина в положении 299;
- остаток серина или треонина в положении 300 в соответствии с нумерацией EU,

причем антитело или иммуноадгезин обладают сниженной связывающей аффинностью к рецептору FcγRI и/или FcγRIIIa по сравнению с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.

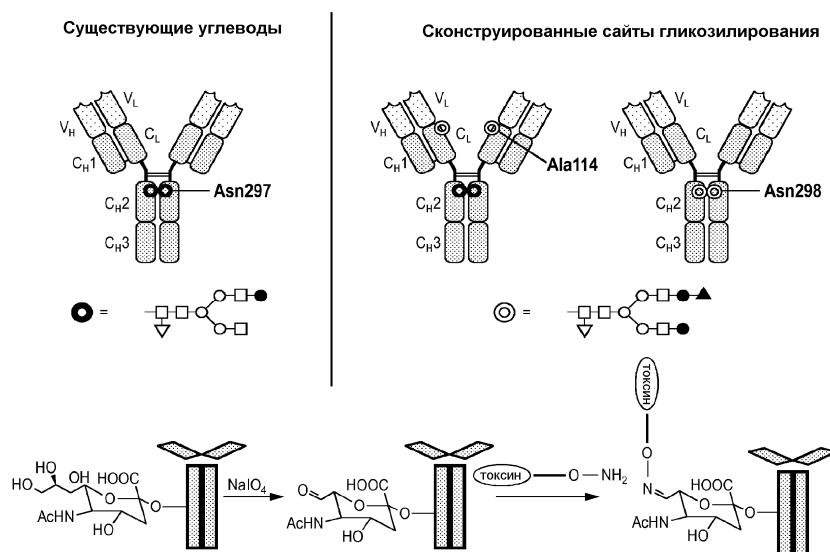
30. Выделенное антитело или иммуноадгезин, включающий домен Fc IgG4 человека с измененным гликозилированием, причем домен Fc содержит  
остаток гликозилированного аспарагина в положении 298;  
остаток аланина в положении 299;  
остаток серина или треонина в положении 300 в соответствии с нумерацией EU,  
причем антитело или иммуноадгезин обладают сниженной связывающей аффинностью к рецептору FcγRI и/или FcγRIIIa по сравнению с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.

31. Выделенное антитело или иммуноадгезин по п.30, где домен Fc содержит шарнирную область с мутацией Ser228Pro в соответствии с нумерацией EU.

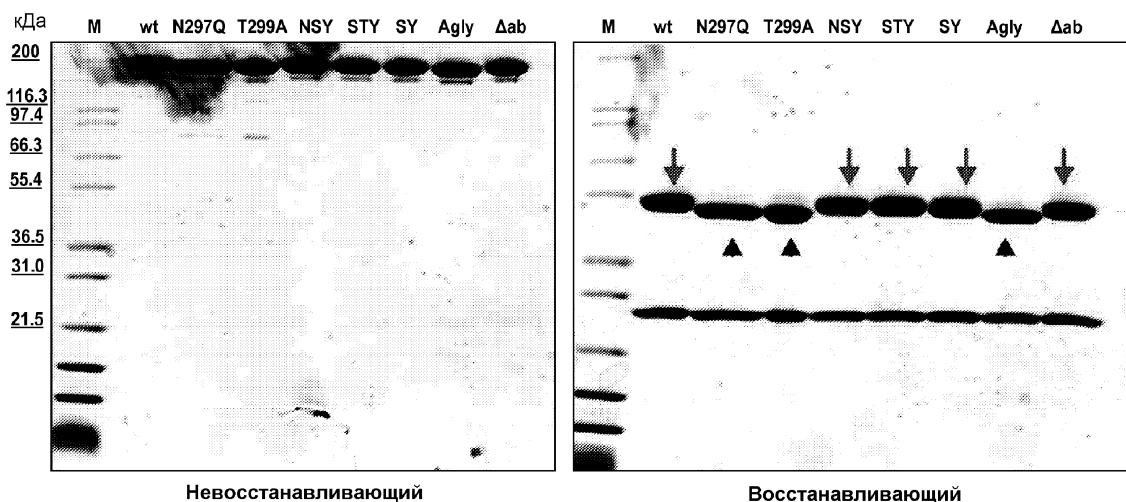
32. Выделенное антитело или иммуноадгезин, включающий домен Fc IgG4 человека с измененным гликозилированием, причем домен Fc содержит

- остаток аспарагина в положении 297;
- остаток аспарагина в положении 298;
- остаток аланина в положении 299;
- остаток серина в положении 300 в соответствии с нумерацией EU,

причем антитело или иммуноадгезин обладают сниженной связывающей аффинностью к рецептору FcγRI и/или FcγRIIIa по сравнению с антителом или иммуноадгезином с нативным доменом Fc.

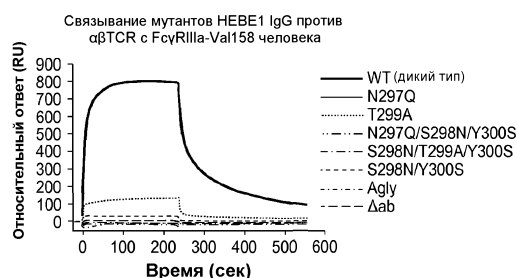


Фиг. 1

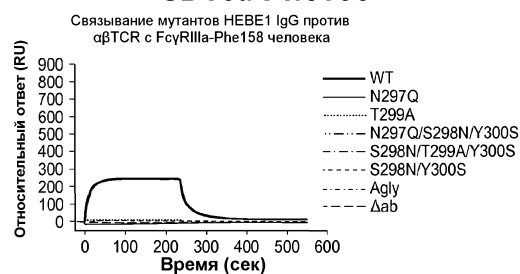


Фиг. 2

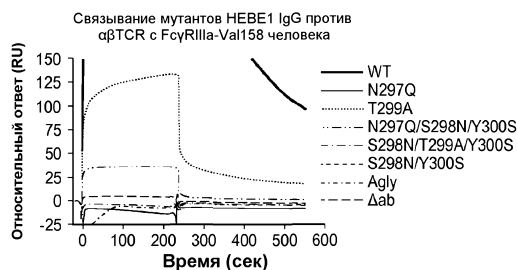
### Полный масштаб: *CD16a-Val158*



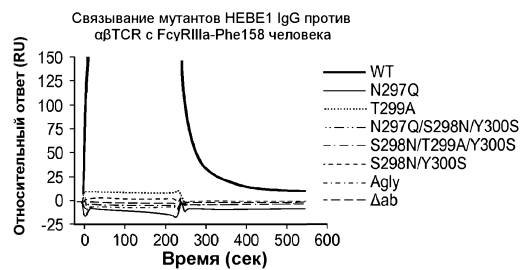
### Полный масштаб: *CD16a-Phe158*



### Масштабирование:

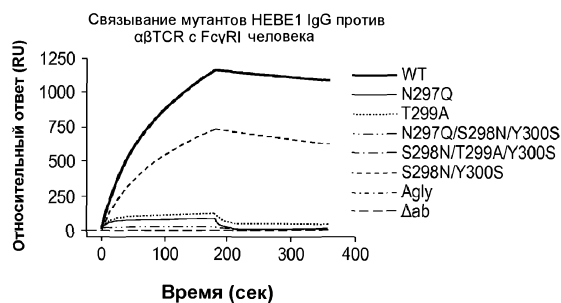


### Масштабирование:

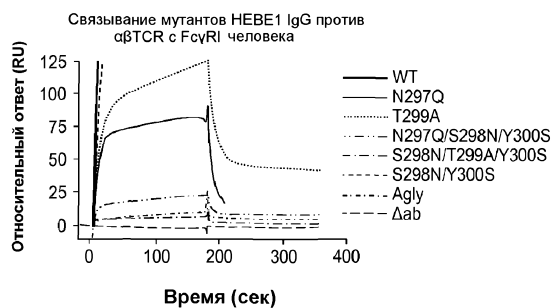


Фиг. 3

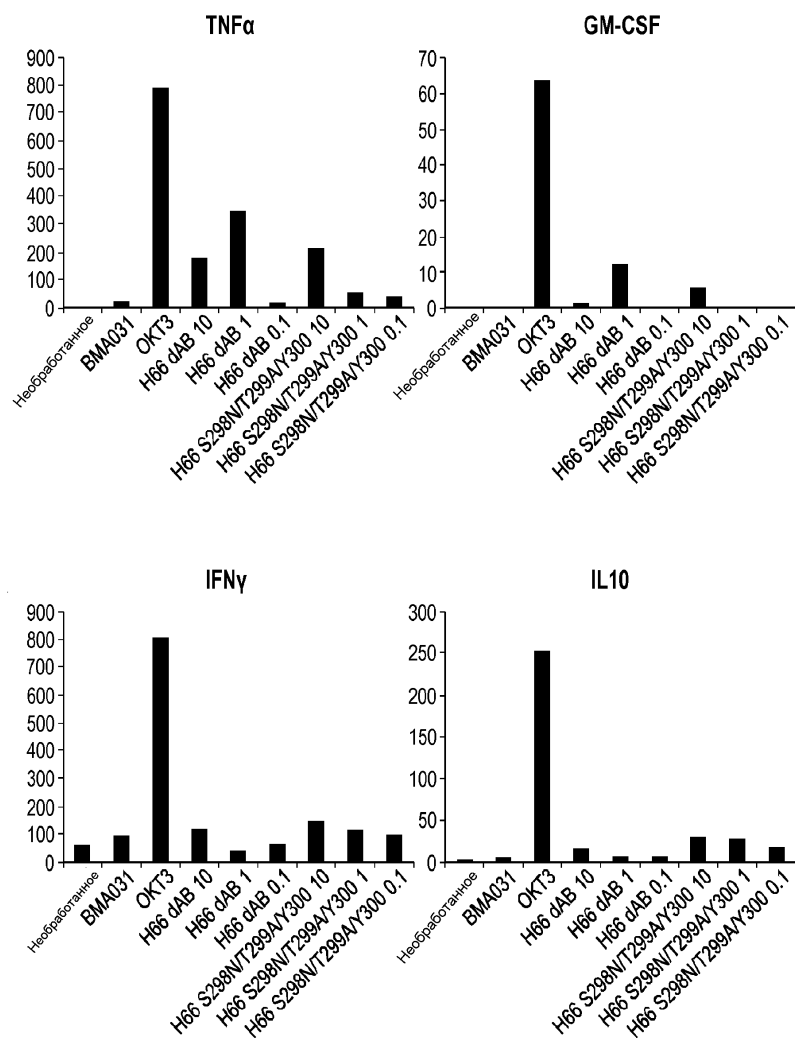
### Полный масштаб:



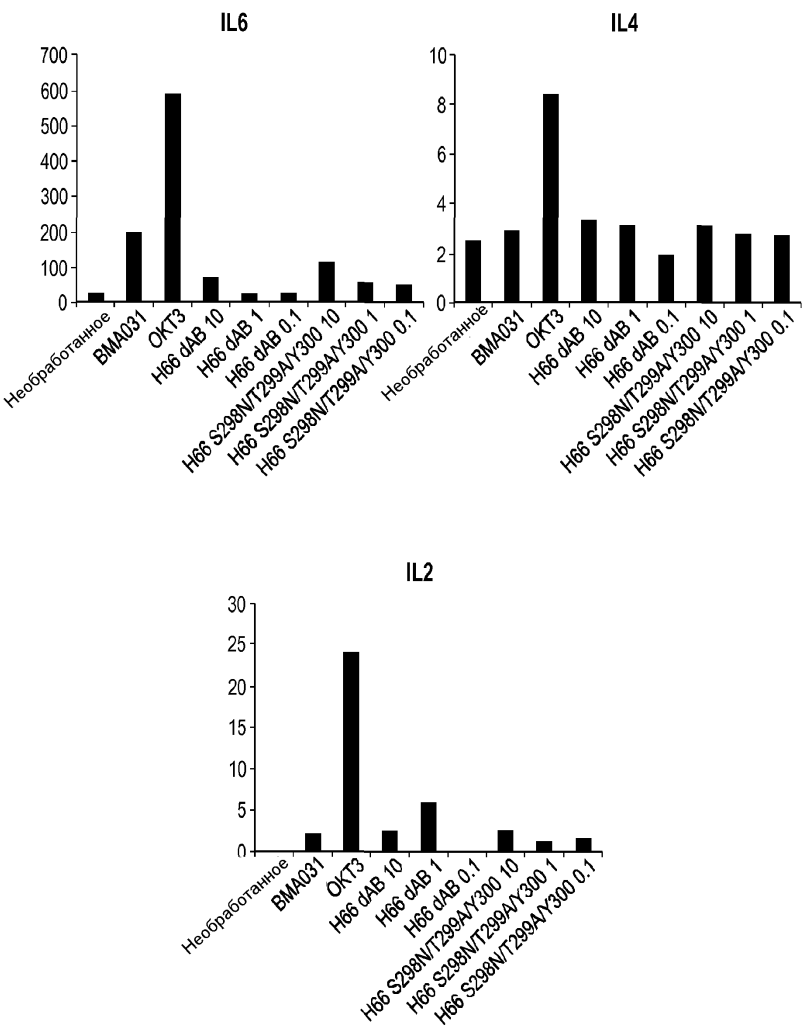
### Масштабирование:



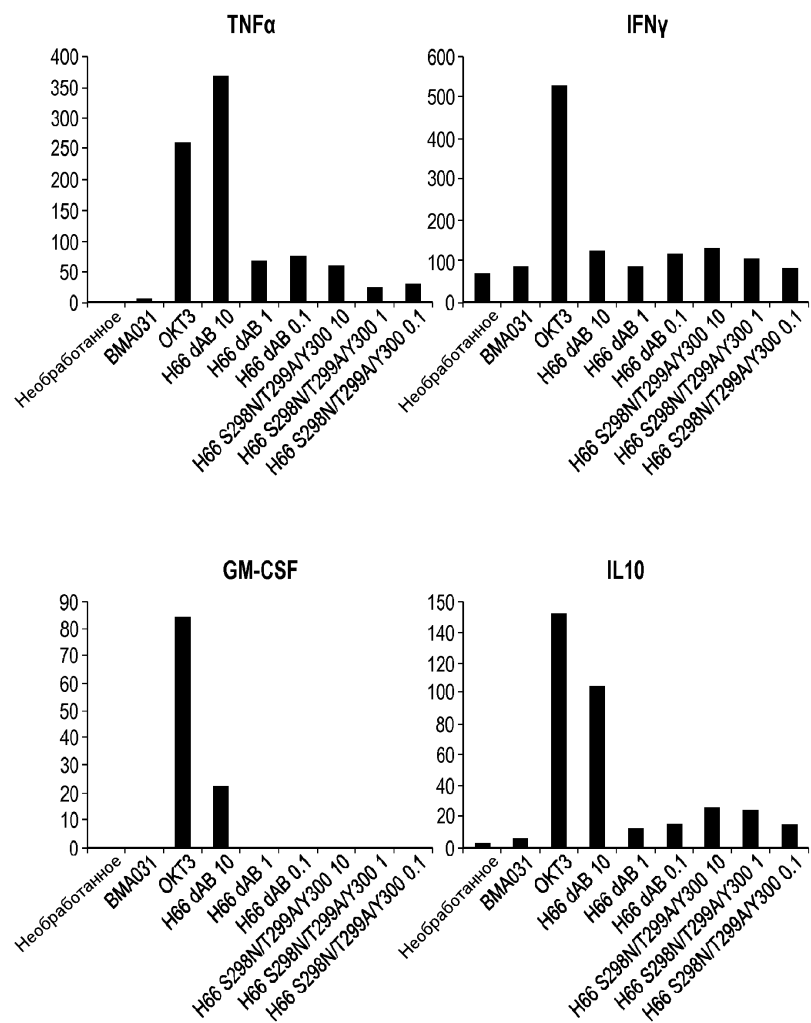
Фиг. 4



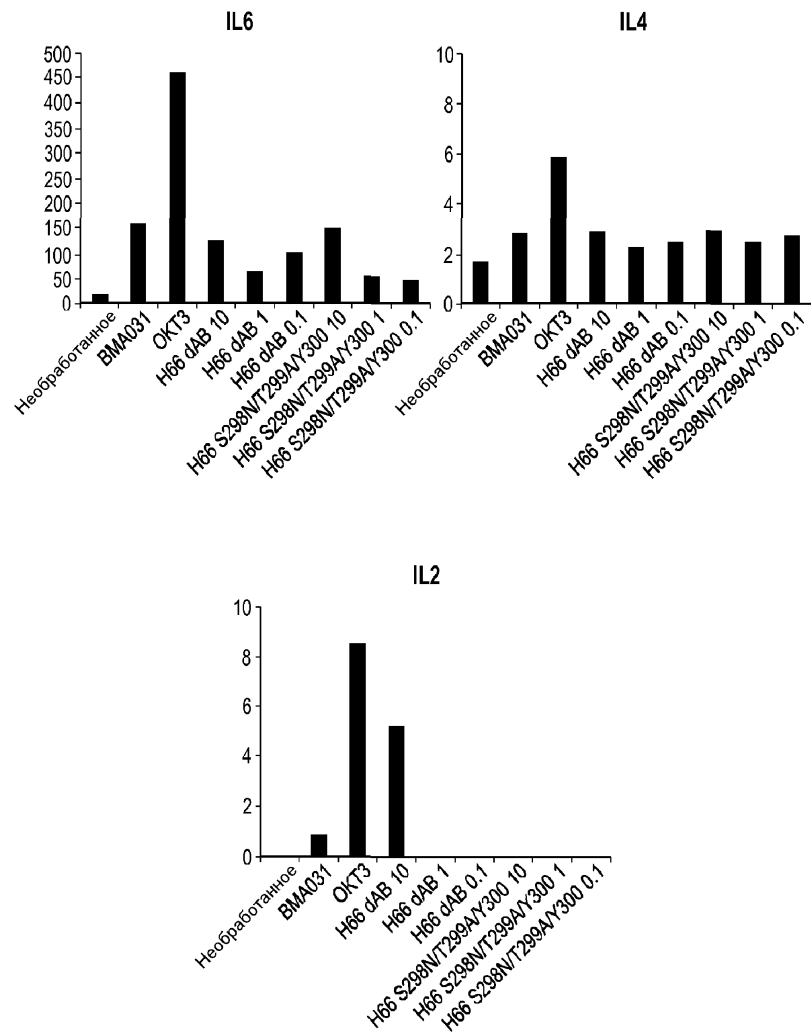
Фиг. 5



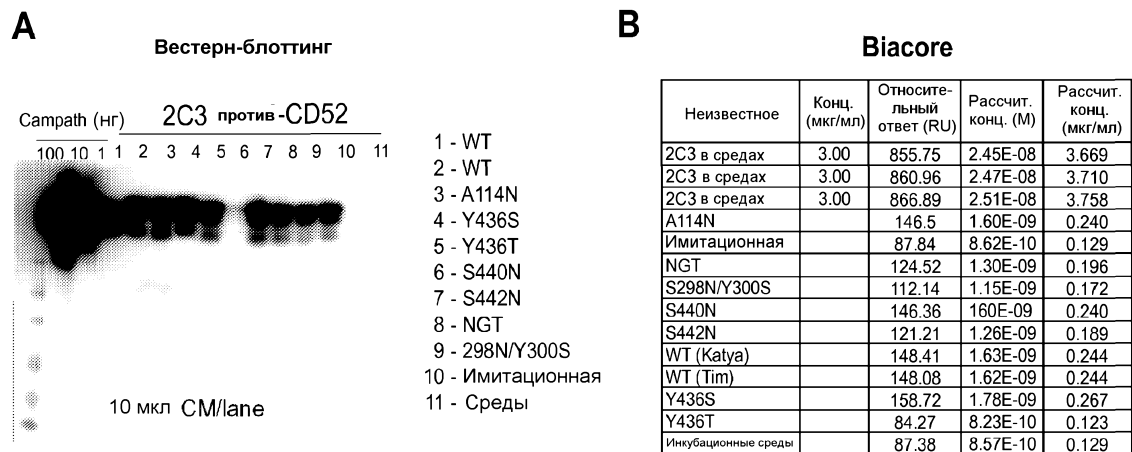
Фиг. 6



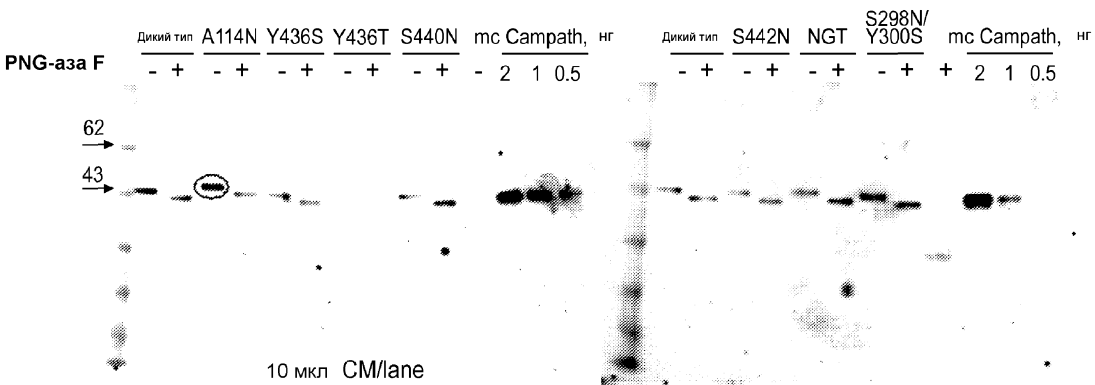
Фиг. 7



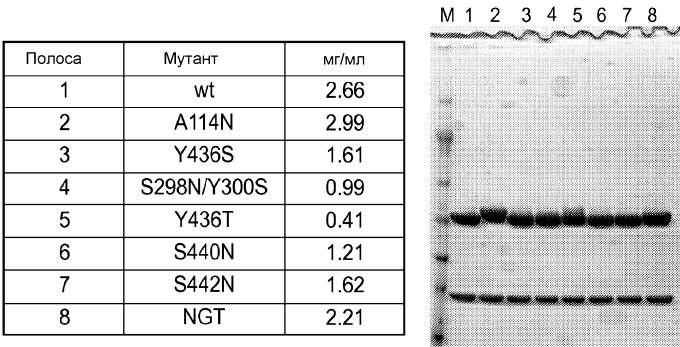
Фиг. 8



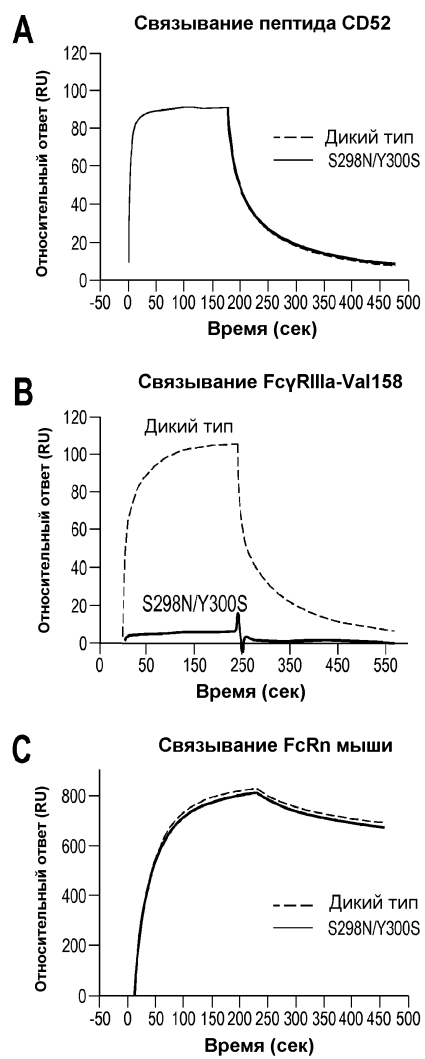
Фиг. 9



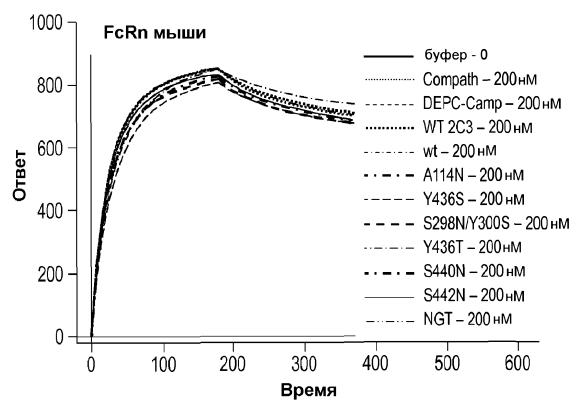
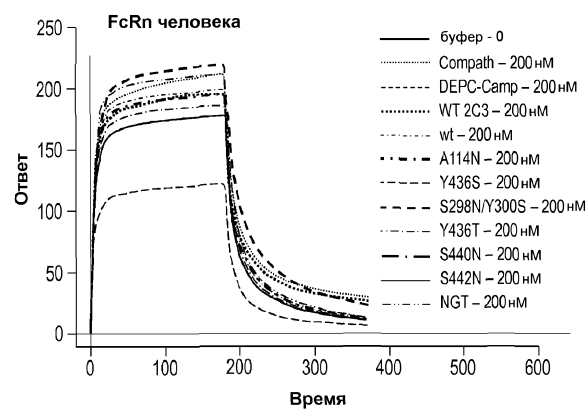
Фиг. 10



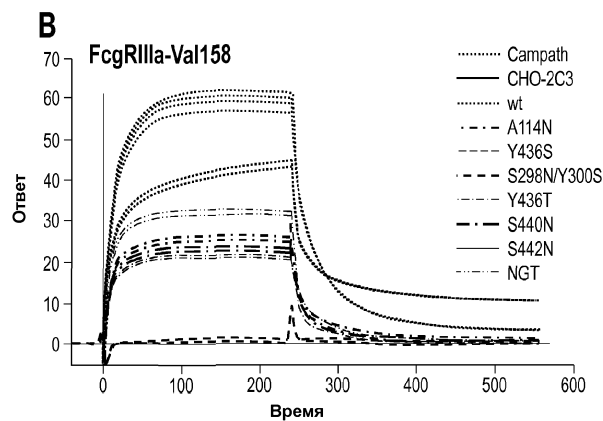
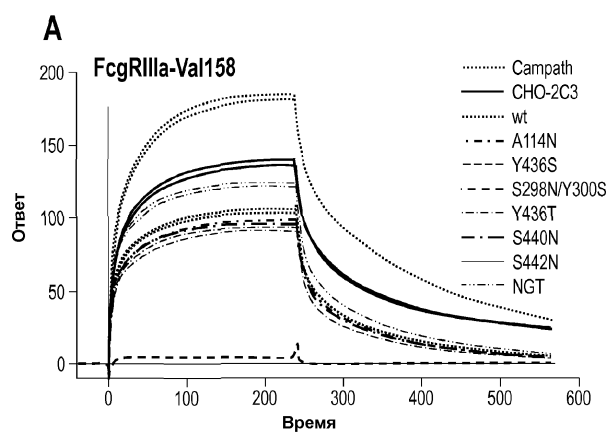
Фиг. 11



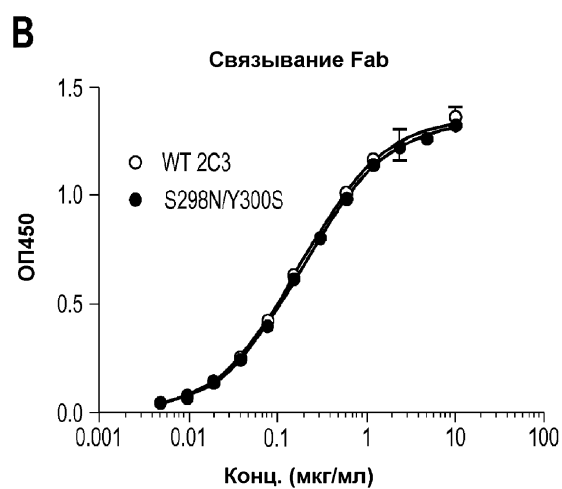
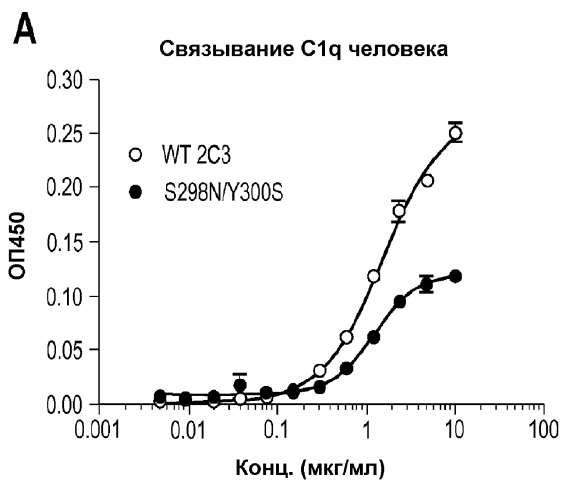
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



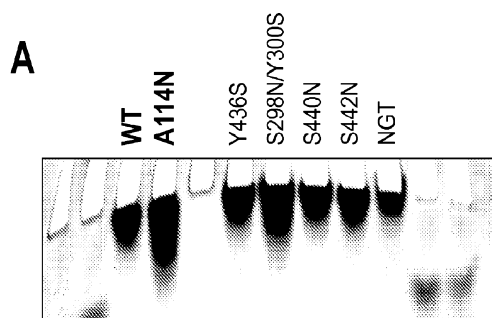
Фиг. 15

Образец	$k_a (\times 10^6 / \text{мсек})$	$k_d (\times 10^{-2} / \text{сек})$	$R_{\text{max}} (\text{RU})$	$K_D (\text{нМ})$
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

Фиг. 16

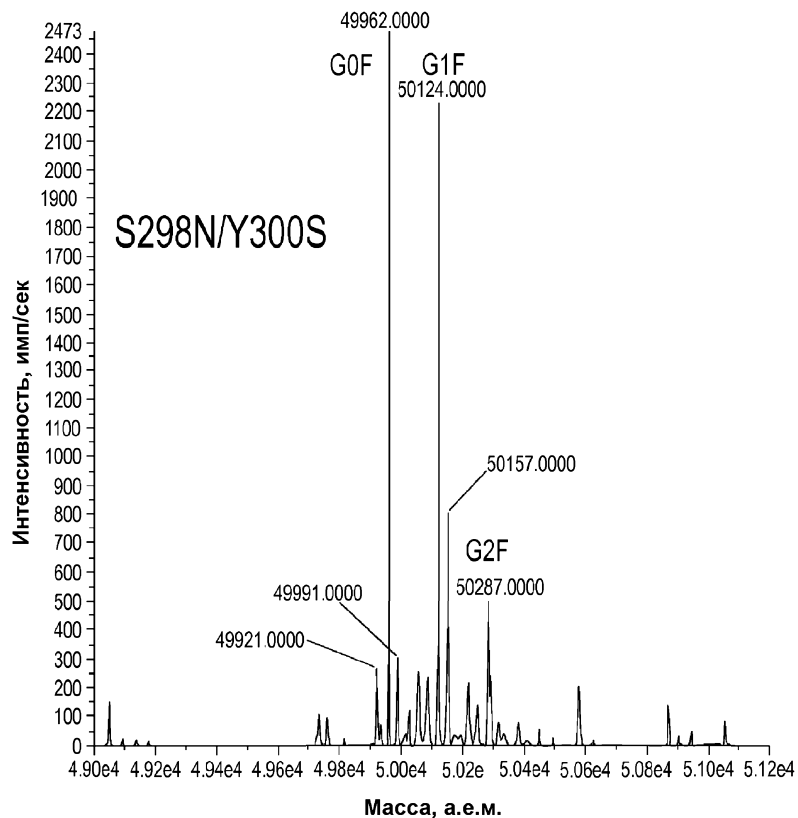
Образец	$K_{\text{on}} (\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{сек}^{-1})$	$K_{\text{off}} (\times 10^{-2} \text{сек}^{-1})$	$KD (\text{нМ})$
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

Фиг. 17

**B**

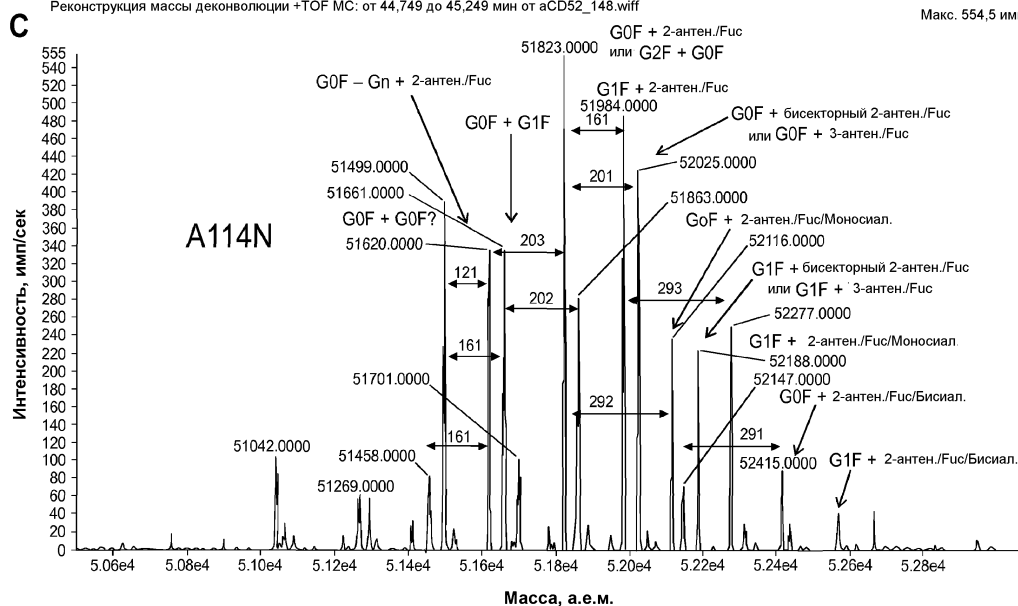
Реконструкция массы деконволюции +TOF  
 MC: от 34,114 до 45,998 мин от aCD52\_147.wiff

Макс. 2473.3 имп/сек

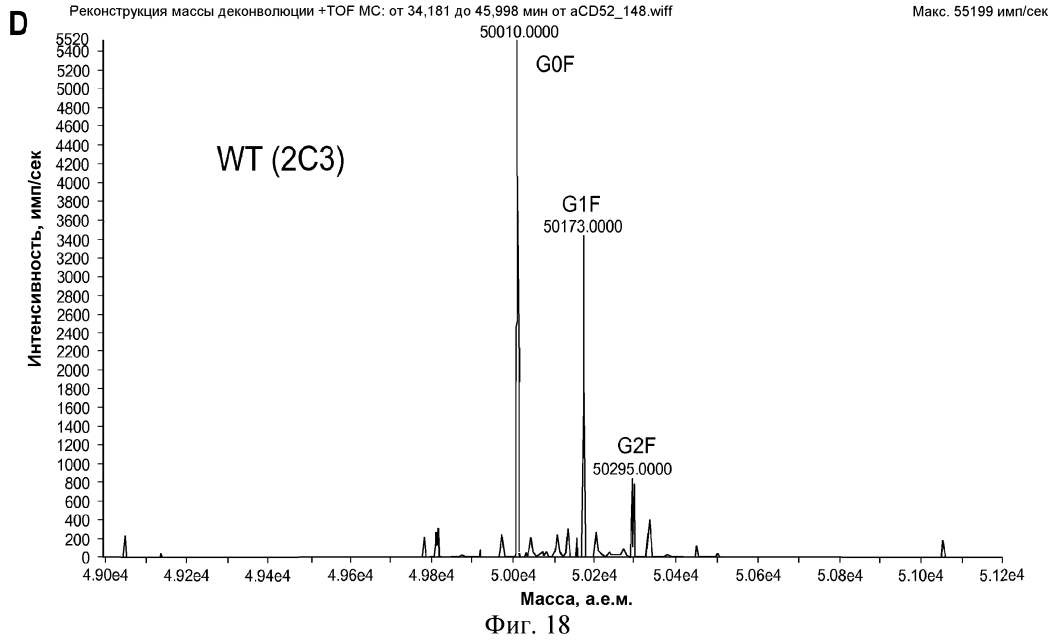


Реконструкция массы деконволюции +TOF MC: от 44,749 до 45,249 мин от aCD52\_148.wiff

Макс. 554,5 имп/сек



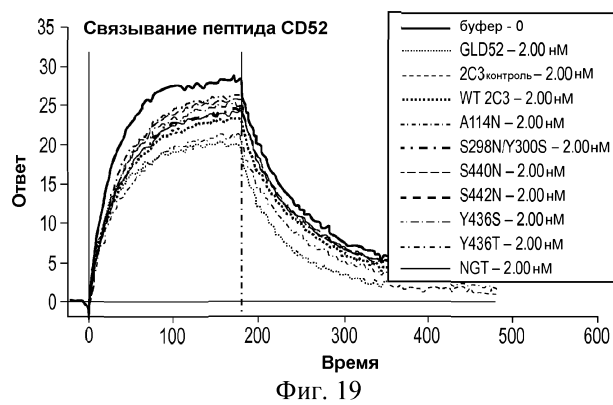
035987

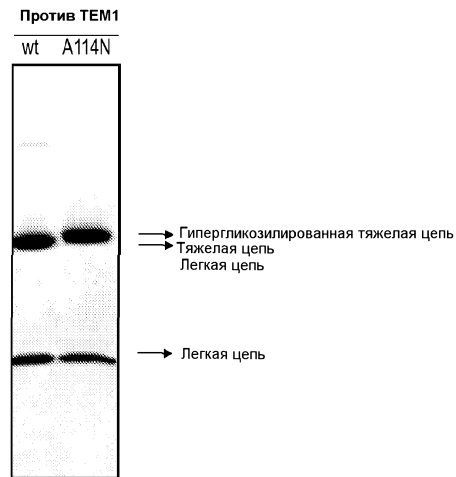


**A**

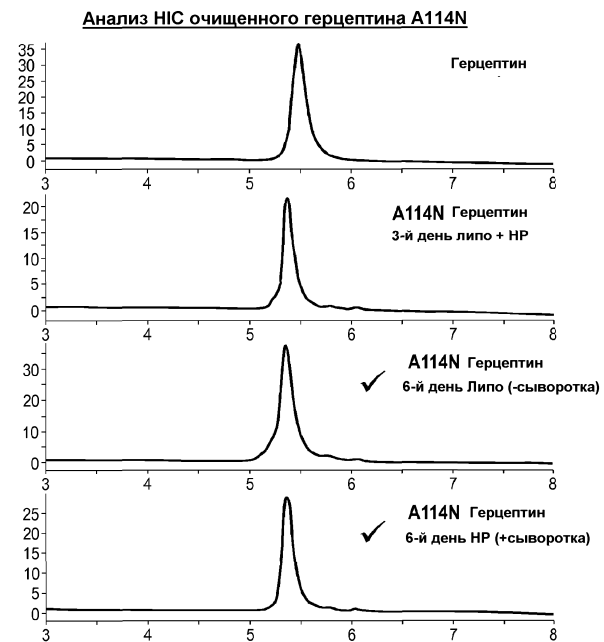
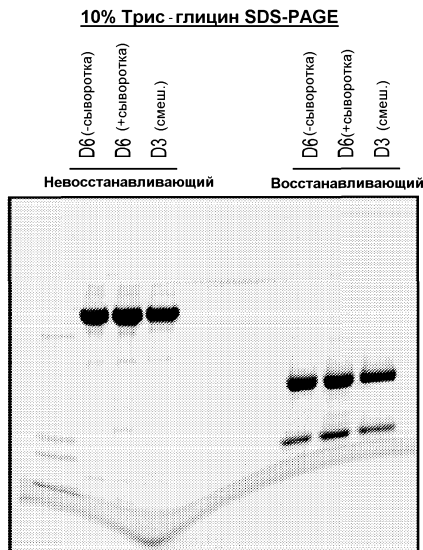
Образец	Лот	Конц. Octet (мкг/мл)
Имитационные среды	11/23/2009	Слишком низкая
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

**B**

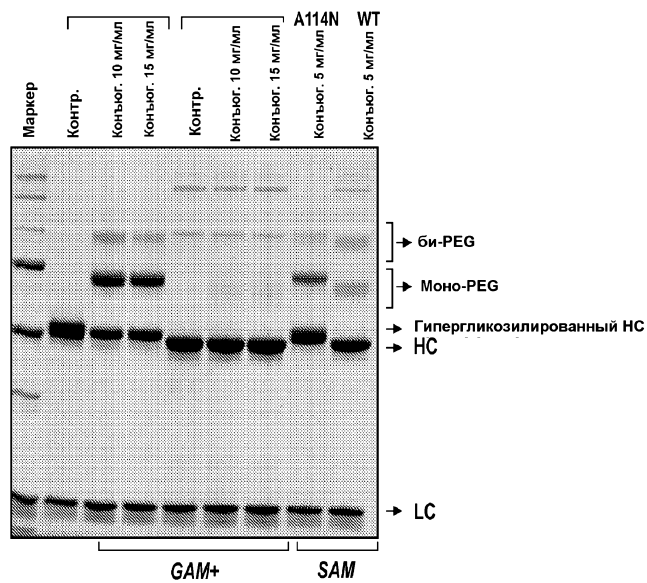




Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

Тяжелая цепь  
A114N  
против TEM1

Интенсивность, имп/сек

728  
700  
650  
600  
550  
500  
450  
400  
350  
300  
250  
200  
150  
100  
50  
0

5.10e4 5.15e4 5.20e4 5.25e4 5.30e4 5.35e4 5.40e4 5.45e4 5.50e4

Масса, а.е.м.

51100.00

52092.00

52209.00

52292.00

52439.00

52601.00

52762.00

52908.00

53055.00

53200.00

53344.00

53507.00

53669.00

G0F+ Каркас+GlcNAc

G0F+Man5

G0F+G0

G0F+G2F

G0F+G0F

G0F+G1F

G0+

G0F+ 2-антен./Fuc/Моносиал.

G0F+ 2-антен./Fuc/Бисиа.

G1F+ 2-антен./Fuc/Бисиа.

G2F+ 2-антен./Fuc/Бисиа.

G0F+ 2-антен./Бисиа.  
или G0+ 2-антен./Fuc/Бисиа.

147

162

161

147

147

289

163

230

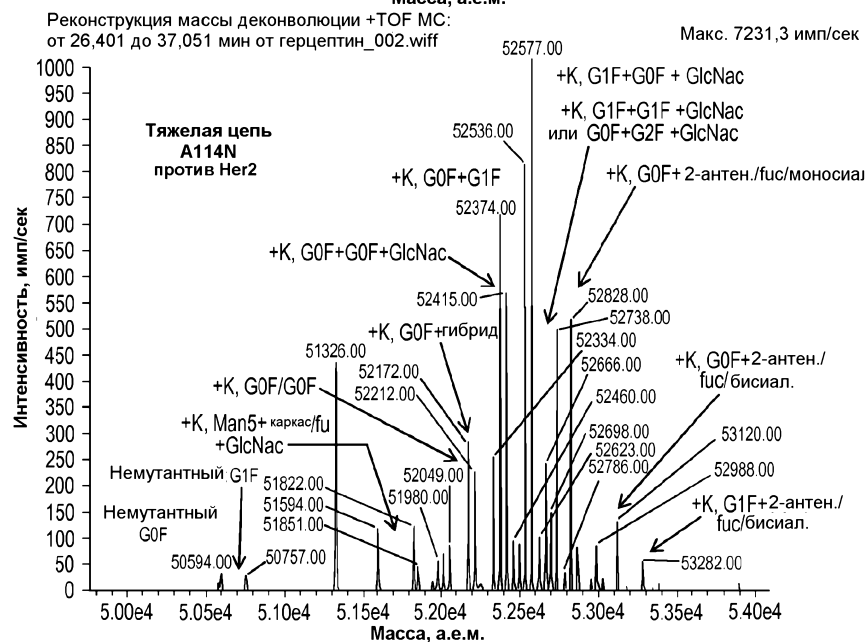
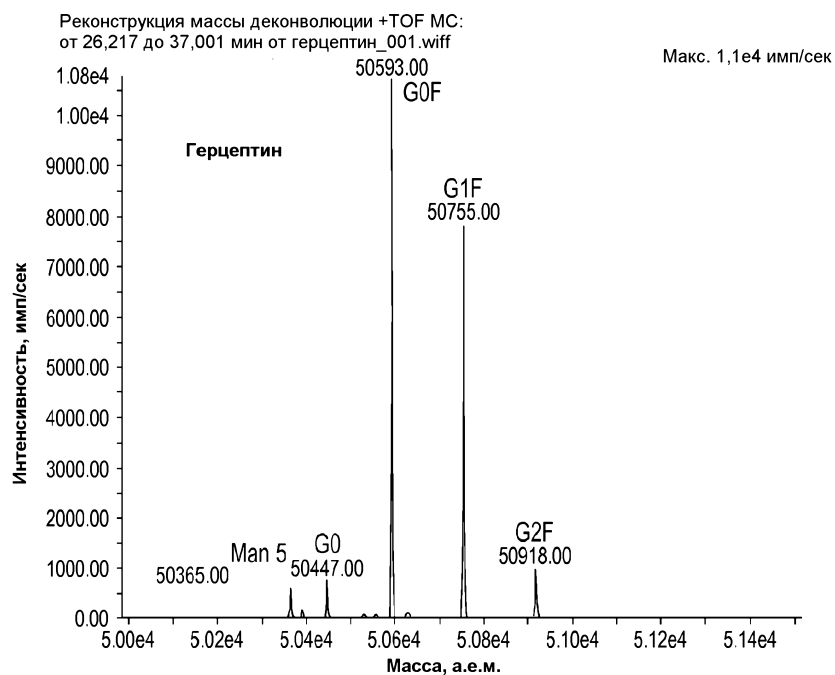
292

160

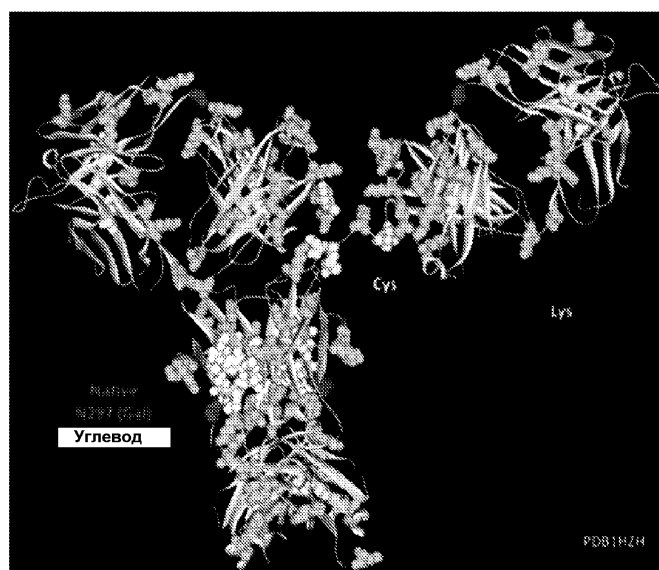
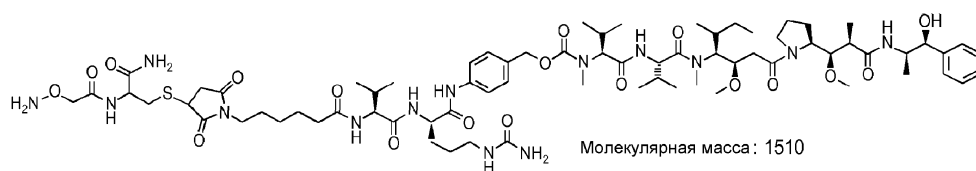
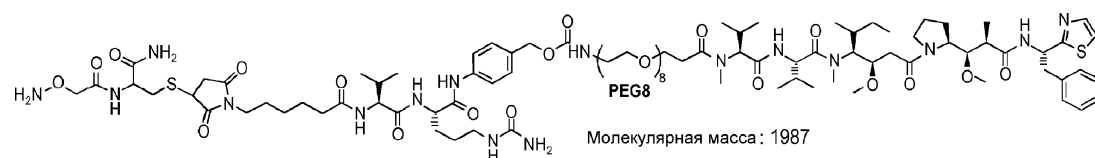
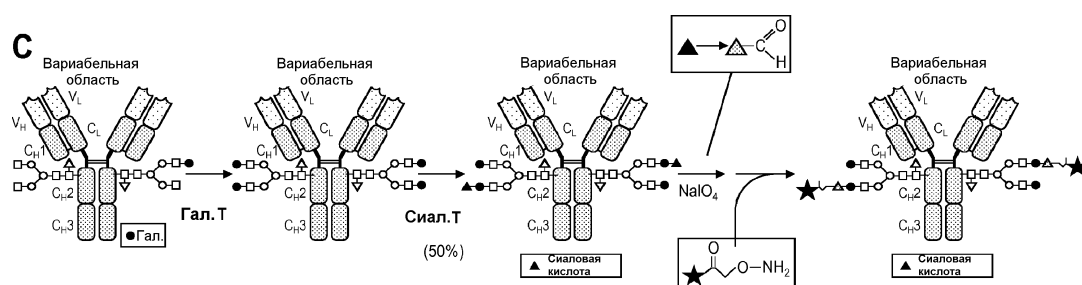
200

162

Фиг. 23

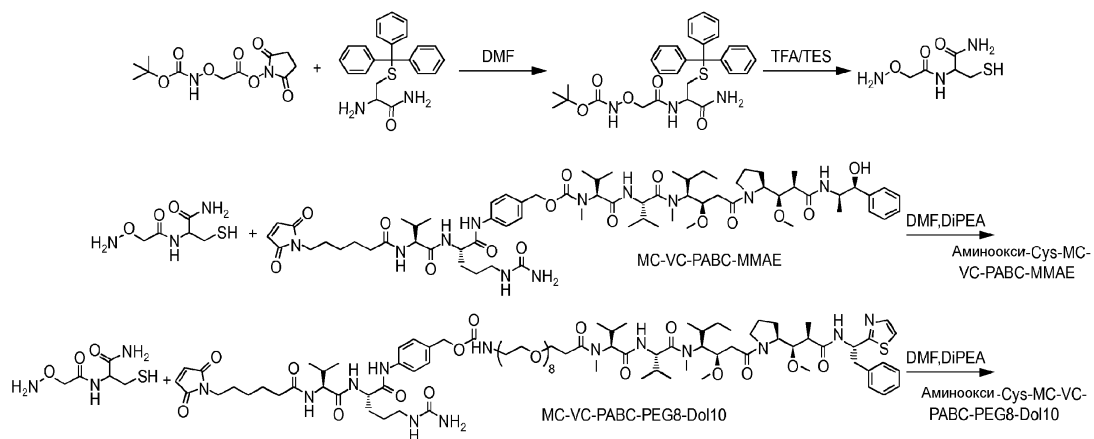


Фиг. 24

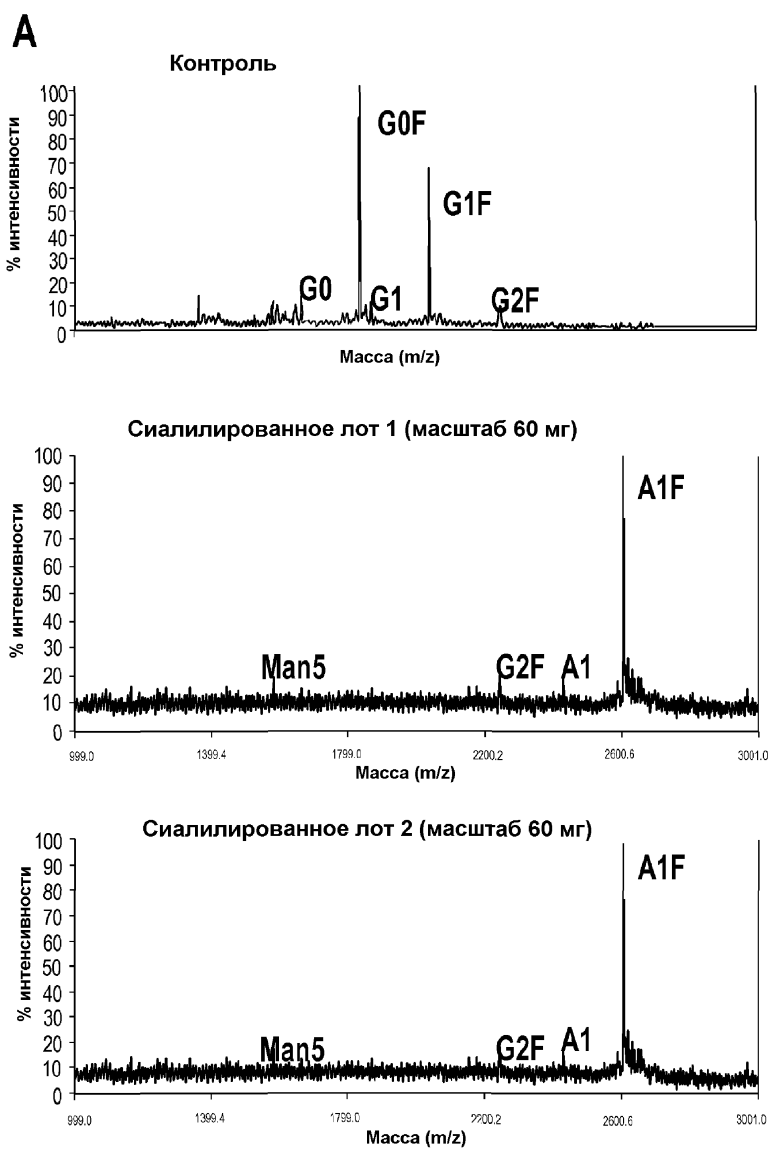
**A****B****Аминоокси-Cys\_MC-VC-PABC-MMAE****Аминоокси-Cys\_MC-VC-PABC-PEG8-Dol10****C**

Фиг. 25

## Синтез аминокси-Cys-MC-VC-PABC-MMAE и аминокси-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10



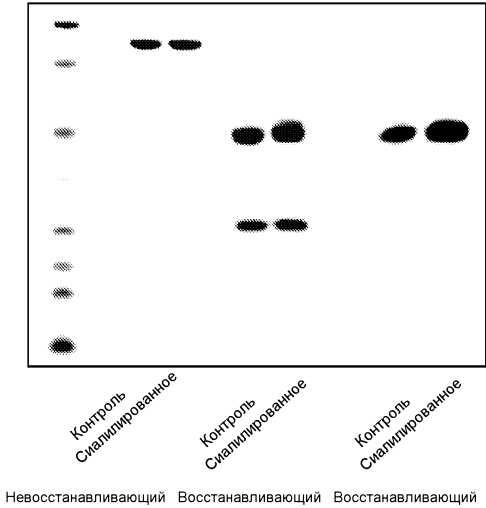
Фиг. 26



**В**

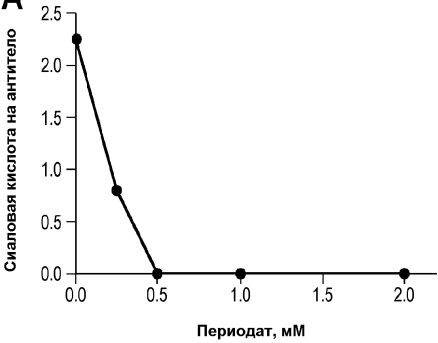
	Сиаловая кислота, моль/моль
Контроль	0
Сиалилированное лот 1	$2.2 \pm 0$
Сиалилированное лот 2	$2.3 \pm 0.1$

**С**

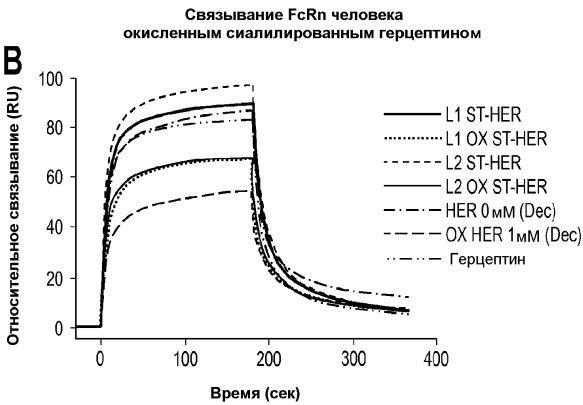


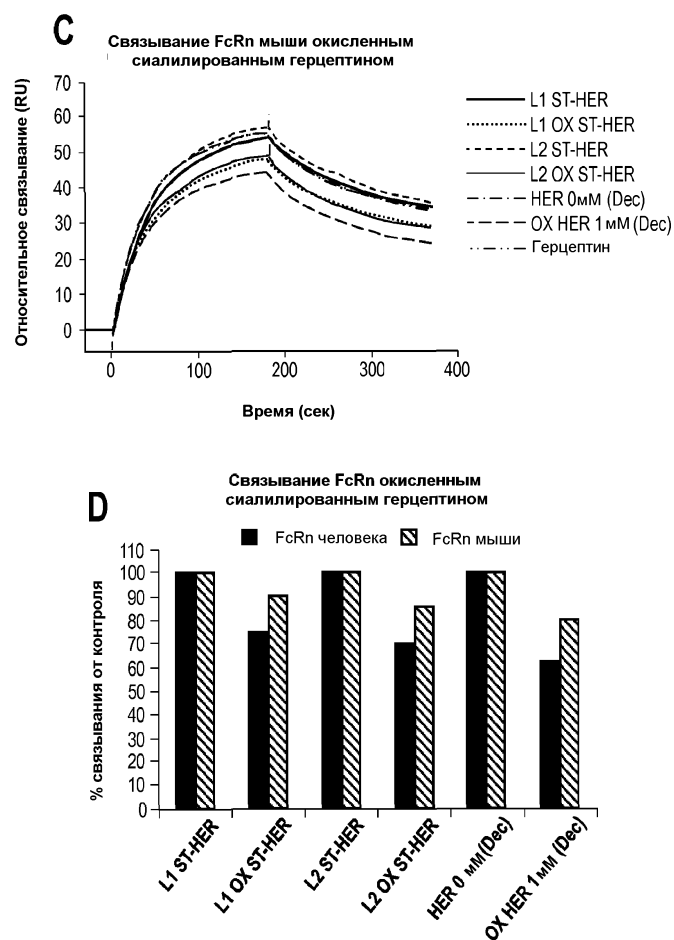
Фиг. 27

**А**

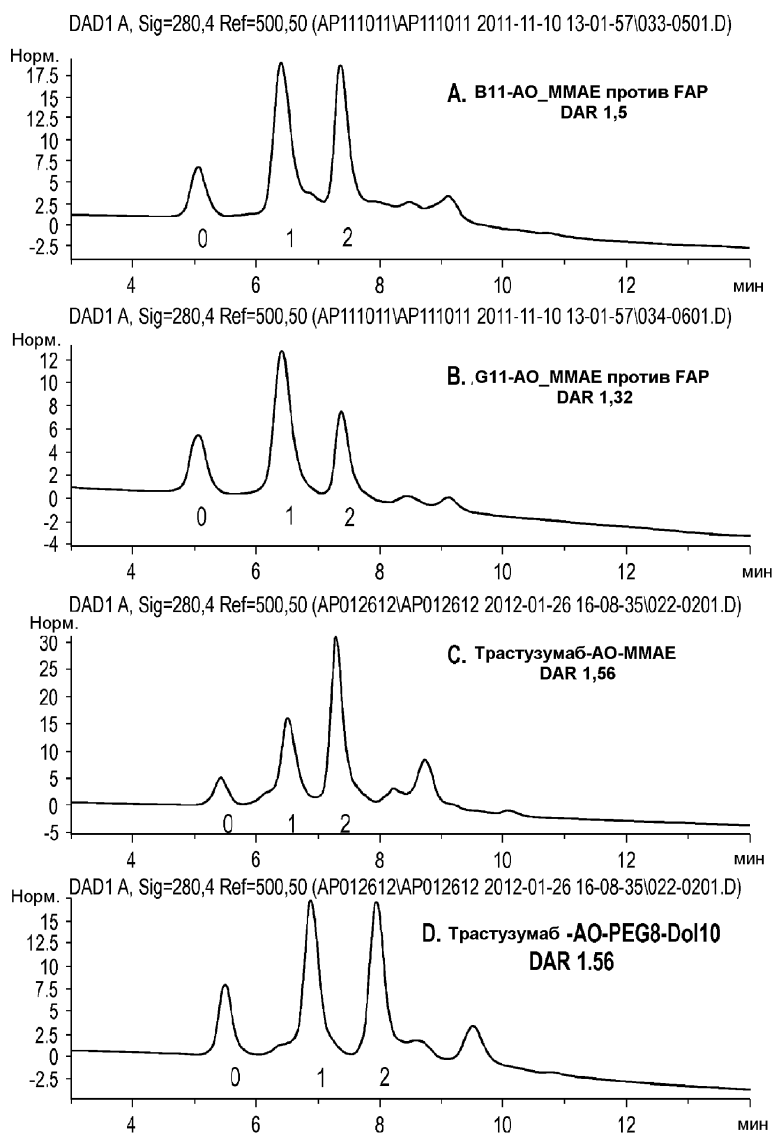


**В**

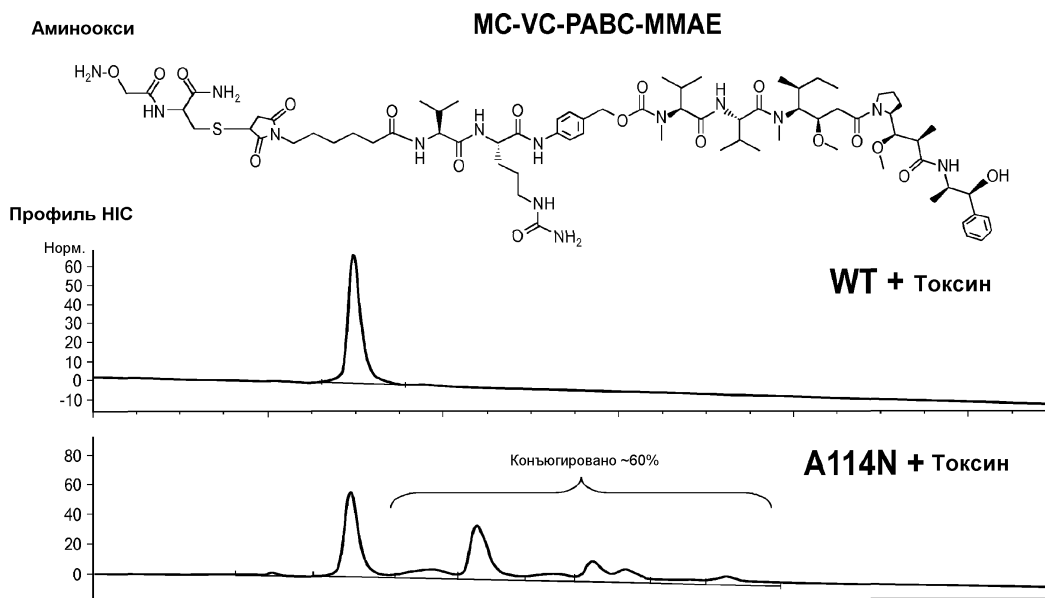




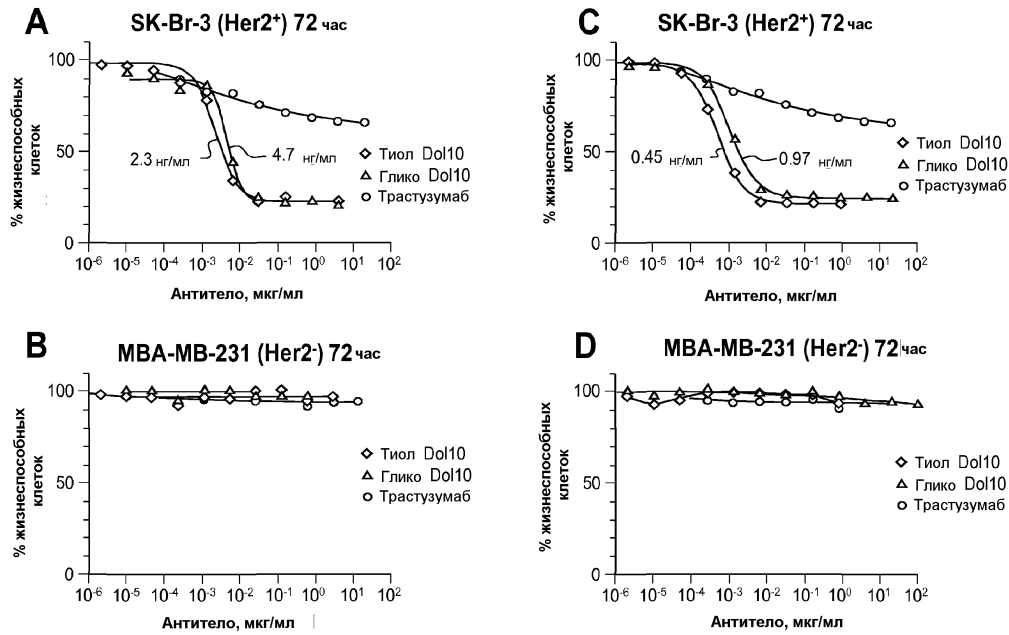
Фиг. 28



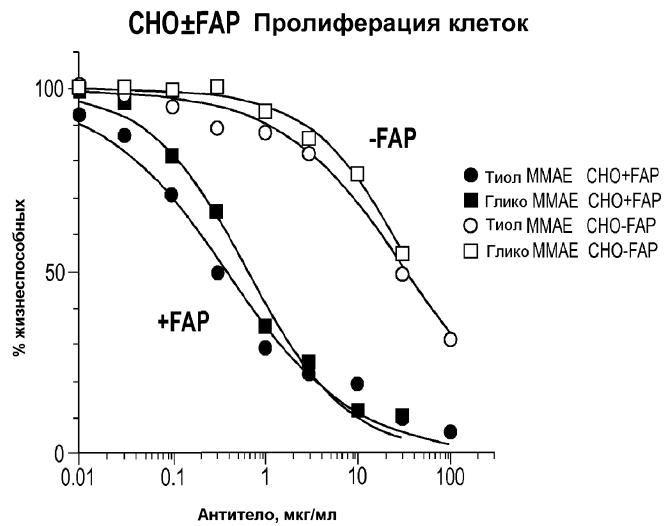
Фиг. 29



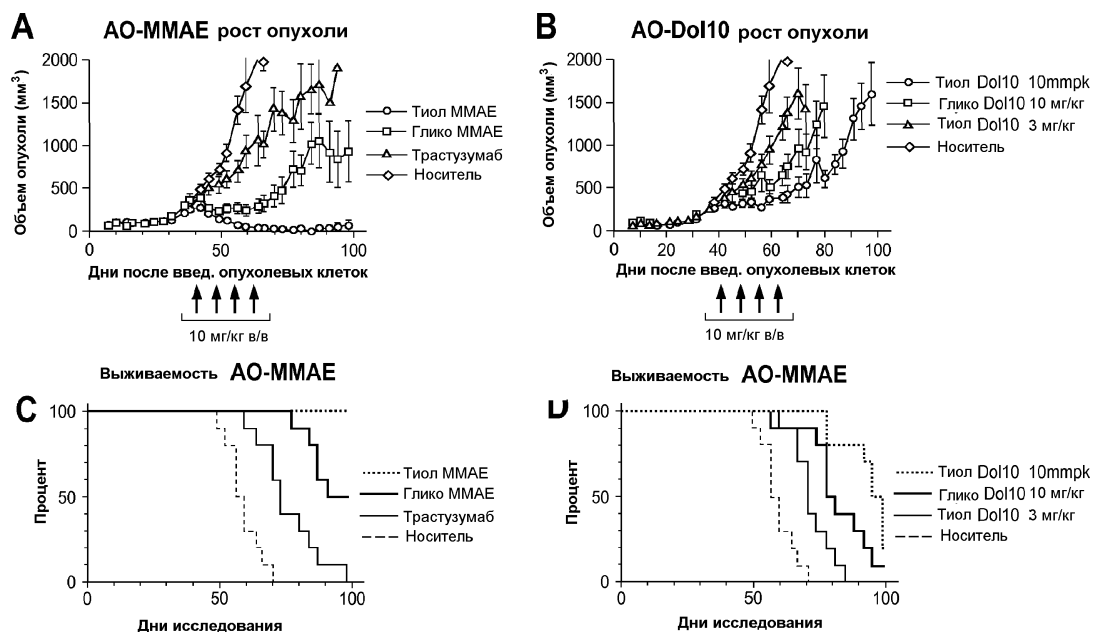
Фиг. 30



Фиг. 31

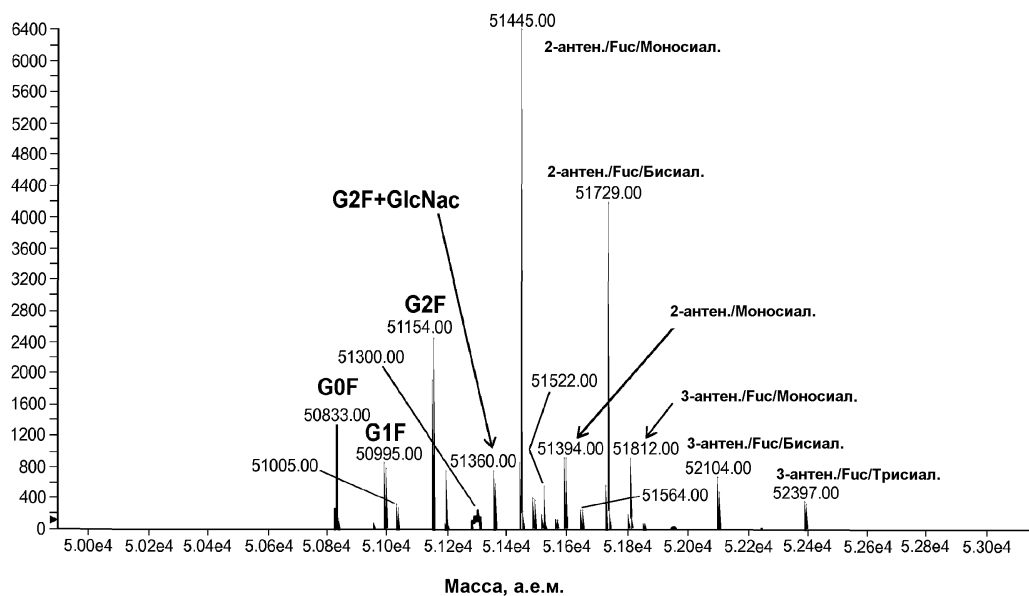


Фиг. 32

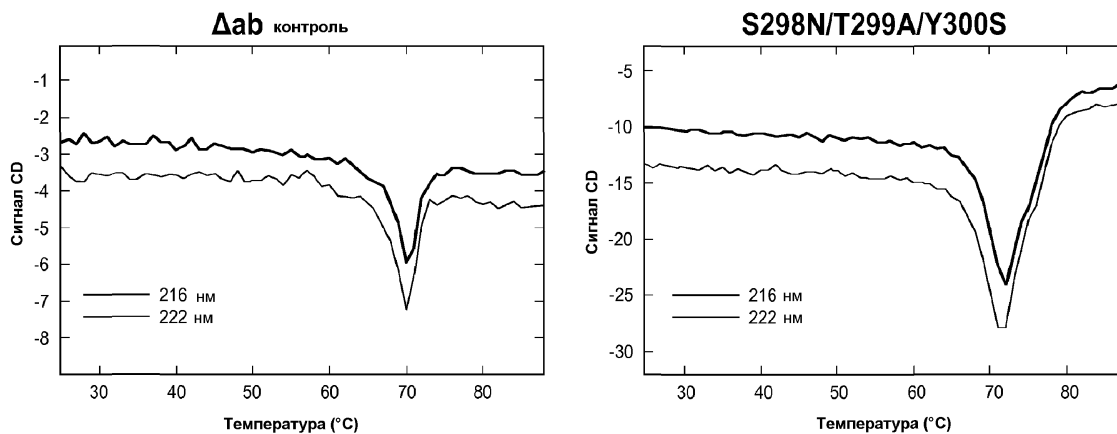


Фиг. 33

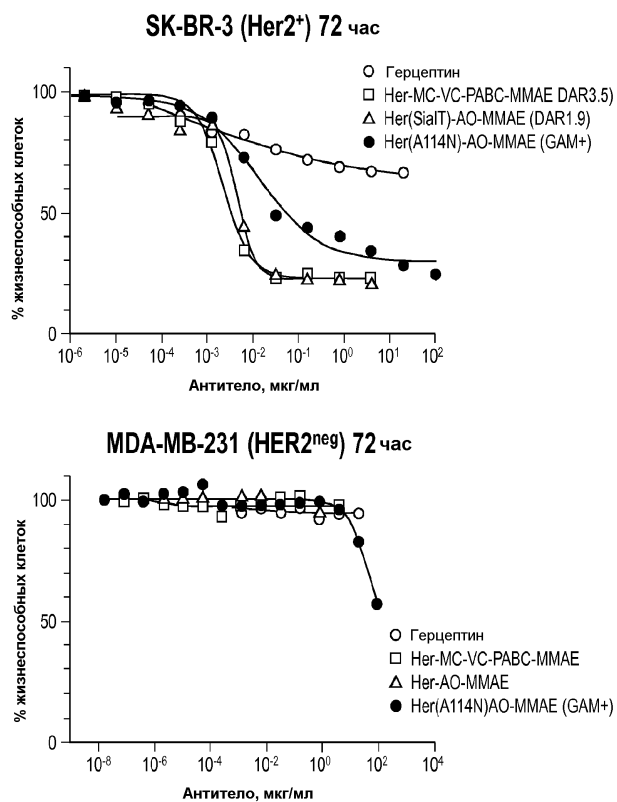
## ЖХ/МС тяжелой цепи S298N/T299A/Y300S (NNAS)



Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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