

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 025962

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2017.02.28

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201100128

(22) Дата подачи заявки  
2004.11.05

(54) АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ ПОВЫШЕННОЙ АФФИННОСТЬЮ К СВЯЗЫВАНИЮ  
С Fc-РЕЦЕПТОРОМ И ЭФФЕКТОРНОЙ ФУНКЦИЕЙ

(31) 60/517,096

(56) WO-A-03011878  
POLYAK MARIA J. ET AL.: "Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure", BLOOD, W.B. SAUNDERS CÓMPANÝ, ORLANDO, FL, US, vol. 99, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 3256-3262, XP002308044, ISSN: 0006-4971, page 3259; tab. 2

(32) 2003.11.05

CRAGG MARK S. ET AL.: "Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts", BLOOD, 1 FEB 2003, vol. 101, no. 3, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 1045-1052, XP002329935, ISSN: 0006-4971, page 1051, left-hand column - right-hand column

(33) US

DAVIES J. ET AL.: "Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 74, no. 4, 20 August 2001 (2001-08-20), pages 288-294, XP002285964, ISSN: 0006-3592, the whole document

(43) 2011.06.30

US-A1-2003003097

(62) 200600905; 2004.11.05  
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
РОШЕ ГЛИКАРТ АГ (CH)

WO-A-0067796

(72) Изобретатель:

Умана Пабло, Брюнкер Петер,  
Феррара Клаудиа, Зутер Тобиас,  
Пюнгенер Ursula, Мёсснер Эккхард  
(CH)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н.,  
Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б.,  
Каксис Р.А., Комарова О.М., Белоусов  
Ю.В. (RU)

B1

025962

(57) В изобретении описаны гуманизированные антитела, специфические в отношении человеческого CD20, способы получения таких антител и способы их применения для уничтожения CD20-экспрессирующих клеток лимфомы и ингибирования роста клеток опухоли человека.

025962 B1

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (АСМ). Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к рекомбинантным моноклональным антителам, включая химерные, приматизированные или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью в отношении человеческого CD20. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют такие АСМ, и векторам и клеткам-хозяевам, содержащим такие молекулы нуклеиновых кислот. Изобретение относится также к способам получения АСМ, предлагаемых в изобретении, и к способам применения таких АСМ для лечения заболевания. Кроме того, настоящее изобретение относится к АСМ с модифицированным гликозилированием, которые обладают улучшенными терапевтическими свойствами, включая антитела с повышенной способностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией.

### Известный уровень техники

#### Иммунная система и антитела к CD20.

Иммунная система позвоночных, включая человека, состоит из многих органов и типов клеток, которые участвуют в точном и специфическом распознавании, связывании и разрушении проникших чужеродных микроорганизмов ("антител"). Решающее значение для правильного функционирования иммунной системы играют лимфоциты. Эти клетки производятся в тимусе, селезенке и костном мозге (взрослых особей) и составляют примерно 30% от общего количества лейкоцитов, присутствующих в кровеносной системе взрослого человека. Существует две основные субпопуляции лимфоцитов: Т-клетки и В-клетки. Т-клетки ответственны за опосредуемый клетками иммунитет, в то время как В-клетки ответственны за производство антител (гуморальный иммунитет). Однако при создании типично-го иммунного ответа Т-клетки и В-клетки функционируют независимо: Т-клетки активируются, когда Т-клеточный рецептор связывается с фрагментами антигена, которые связаны с гликопротеинами главного комплекса гистосовместимости ("ГКГ") на поверхности антигенпрезентирующей клетки; такая активация приводит к высвобождению биологических медиаторов ("интерлейкинов"), которые стимулируют В-клетки к дифференцировке и производству антител ("иммуноглобулинов") к антигену.

Каждая В-клетка в организме-хозяине экспрессирует антитело одного конкретного типа и специфичности, а различные В-клетки экспрессируют антитела, специфические в отношении различных антигенов. В-клеточная пролиферация и производство антител выступают в качестве реакции на чужеродный антиген, и то и другое, как правило, прекращается (или существенно уменьшается) после того, как чужеродный антиген нейтрализован. Однако иногда пролиферация конкретной В-клетки может продолжаться без ограничения; такая пролиферация может приводить к раку, который называют "В-клеточной лимфомой".

Как Т-клетки, так и В-клетки содержат белки клеточной поверхности, которые можно использовать в качестве "маркеров" для дифференцировки и идентификации. Одним из таких маркеров человеческих В-клеток является связанный только с человеческими В-лимфоцитами дифференцировочный антиген Вр35, который называют "CD20". CD20 экспрессируется на ранней стадии развития пре-В-клеток и сохраняется до дифференцировки плазматических клеток. В частности, молекула CD20 необходима для регулирования стадии процесса активации, которая требуется для инициации клеточного цикла и дифференцировки, и, как правило, на неопластических ("опухолевых") В-клетках имеет место высокий уровень ее экспрессии. Поскольку высокие уровни CD20 присутствуют на "злокачественных" В-клетках, т.е. на тех В-клетках, неограниченная пролиферация которых может приводить к В-клеточной лимфоме, то поверхностный антиген CD20 может являться кандидатом в качестве "мишени для распознавания" В-клеточных лимфом.

По существу, процесс "распознавания мишени" можно обобщить следующим образом: антитела, специфические в отношении поверхностного антигена CD20 на В-клетках, вводят пациенту, например, путем инъекции. Эти антитела к CD20 специфически связываются с клеточным поверхностным антигеном CD20 (очевидно) как на здоровых, так и на злокачественных В-клетках; антитело к CD20, связанное с поверхностным антигеном CD20, может приводить к разрушению и истощению неопластических В-клеток. Кроме того, с антителом к CD20 можно конъюгировать химические агенты или радиоактивные метки, обладающие способностью разрушать опухоль, так чтобы осуществлять специфический "перенос" агента, например, к неопластическим В-клеткам. Независимо от подхода основной целью является разрушение опухоли: конкретный подход может определяться выбором конкретного применяемого антитела к CD20 и, таким образом, пригодные подходы для распознавания в качестве мишени антигена CD20 могут широко варьироваться.

Неконъюгированные моноклональные антитела (МАт) можно применять в качестве лекарственных средств для лечения рака, о чем свидетельствует разрешение Департамента по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (US Food and Drug Administration) применения ритуксимаба (Rituxan™; фирма IDEC Pharmaceuticals, Сан-Диего, шт. Калифорния, и фирма Genetech Inc., Сан-Франциско, шт. Калифорния) для лечения CD20-позитивной В-клеточной, низкозлокачественной или фолликулярной неходжкинской лимфомы, трастузумаба (Негрсептин™, фирма Genetech

Inc.) для лечения развитого рака молочной железы (Grillo-Lopez A.-J и др., Semin. Oncol., 26, 1999, с. 66-73; Goldenberg M.M., Clin. Ther., 21, 1999, с. 309-318), гемтузумаба (Mylotarg™, фирма Genentech/Wyeth-Ayerst) для лечения рецидива острого миелоидного лейкоза и алемтузумаба (CAMPATH™, фирма Millennium Pharmaceuticals/Schering AG) для лечения В-клеточного хронического лимфолейкоза. Успешное применение этих продуктов обусловлено не только их эффективностью, но и их очень хорошими профилиями безопасности (Grillo-Lopez A.-J. и др., Semin. Oncol., 26, 1999, с. 66-73; Goldenberg M.M., Clin. Ther., 21, 1999, с. 309-318). В свете успехов, связанных с этими лекарственными средствами, в настоящее время существует большая потребность в достижении более высокой специфической активности антител по сравнению с той, которая, как правило, обеспечивается при лечении с использованием неконъюгированного МАт. Другим антителом, обладающим специфичностью в отношении человеческого CD20, является мышиное моноклональное антитело B-Ly1 (Poppetta S. и Visser L., Biotest Bulletin, 3, 1987, с. 131-139).

Результаты многочисленных исследований позволяют предположить, что зависящие от Fc-рецептора механизмы оказывают существенное влияние на действие цитотоксичных антител на опухоли и указывают на то, что оптимальное антитело, действующее на опухоли, должно связываться предпочтительно с Fc-рецепторами-активаторами и в минимальной степени с партнером-ингибитором FcγRIIB (Clynes R.A. и др., Nature Medicine, 6(4), 2000, с. 443-446; Kalergis A.M. и Ravetch J.V., J. Exp. Med., 195(12), июнь 2002, с. 1653-1659). Например, результаты по меньшей мере одного исследования позволяют, в частности, предположить, что FcγRIIIa-рецептор имеет большое значение для эффективности терапии с использованием антител (Cartron G. и др., Blood, 99(3), февраль 202, с. 754-757). В этом исследовании установлено, что пациенты, гомозиготные по FcγRIIIa, дают лучшую реакцию на ритуксимаб, чем гетерозиготные пациенты. Авторы сделали вывод о том, что более высокая реакция обусловлена лучшим связыванием антитела с FcγRIIIa *in vivo*, что приводит к более высокой антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC-активности) в отношении клеток лимфомы (Cartron G. и др., Blood, 99(3), февраль 202, с. 754-757).

Известны многочисленные попытки использовать в качестве мишени поверхностный антиген CD20. Опубликованы данные о том, что мышиное (мышь) моноклональное антитело 1F5 (антитело к CD20) вводили путем внутривенной непрерывной инфузии пациентам с В-клеточной лимфомой. Было указано, что для истощения опухолевых клеток, присутствующих в кровотоке, необходимы очень высокие уровни ( $> 2$  г) 1F5 и отмечено, что результаты оказывались "кратковременными" (Press и др., Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas, Blood, 69/2, 1987, с. 584-591). Потенциальной проблемой, связанной с этим подходом, является то, что у моноклональных антител из организма, кроме человека (например, у мышиных моноклональных антител), как правило, отсутствует человеческая эффекторная функция, т.е. они неспособны среди прочего опосредовать комплементзависимый лизис или лизировать человеческие клетки-мишени с помощью антитело-обусловленной клеточнозависимой токсичности или путем опосредованного Fc-рецептором фагоцитоза. Кроме того, моноклональные антитела из организма, кроме человека, могут распознаваться человеческим организмом-хозяином как чужеродный белок; поэтому повторные инъекции таких чужеродных антител могут индуцировать иммунные ответы, приводящие к вредным реакциям гиперчувствительности. Для моноклональных антител, выведенных из организма мыши, это явление часто называют человеческим антимышинным гуморальным иммунным ответом или "HAMA"-ответом. Кроме того, эти "чужеродные" антитела могут быть атакованы иммунной системой хозяина, в результате чего они фактически оказываютсянейтрализованными до того, как достигнут своей области-мишени.

Другой известный из литературы подход к усилению способности мышиных моноклональных антител оказывать действие при лечении связанных с В-клетками заболеваний заключался в осуществлении конъюгации радиоактивной метки или токсина с антителом так, чтобы метка или токсин оказались локализованными в области опухоли. Например, опубликованы данные о том, что указанное выше антитело 1F5 "метили" с помощью йода-131 (" $^{131}\text{I}$ ") и оценивали его биораспределение в организме двух пациентов (см. Eary J.F. и др., Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma, J. Nuc. Med. 31/8, 1990, с. 1257-1268; см. также Press O.W. и др., Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody, J. Clin. Onc., 7/8, 1980, с. 1027-1038 (указано, что у одного подвергавшегося лечению меченным с помощью  $^{131}\text{I}$  1F-5 пациента был достигнут "частичный ответ"); Goldenberg D.M. и др., Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labelled LL2 Monoclonal Antibody, J. Clin. Onc, 9/4, 1991, с. 548-564 (указано, что у трех из восьми пациентов, которым делали несколько инъекций, развился HAMA-ответ); Appelbaum F.R., Radiolabelled Monoclonal Antibodies in the treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, Hem./Onc. Clinics of N.A., 5/5, 1991, с. 1013-1025 (обзорная статья); Press O.W. и др., Radiolabelled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support, New England J. Med., 329/17, 1993, с. 1219-1223 (меченные с помощью йода-131 антитела 1F5 и B1 к CD20); Kaminski M.G. и др., Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with  $^{131}\text{I}$  Anti-B1 (Anti-CG20) Antibody, New England J. Med., 329/7, 1993 (меченное с помощью йода-131 антитело B1 к CD20; ниже цитируется как "Kaminski"). Имеются данные о том, что осуществляли также конъюгацию токсина (т.е. химиотерапевтических агентов, таких как доксорубицин или митомицин C) с антителами (см.,

например, опубликованную заявку PCT WO 92/07466 (опубликованную 14 мая 1992 г.)).

В качестве альтернативы "конъюгированным" антителам были разработаны химерные антитела, содержащие фрагменты антител из двух или большего количества различных видов (например, из организма мыши и человека). Например, у Lie A.Y. и др., Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity, J. Immunol., 139/10, 1987, с. 3521-3526, описано химерное мышью/человеческое антитело к антигену CD20 (см. также публикацию PCT WO 88/04936). Для лечения неходжкинской лимфомы был разрешен, например, ритуксимаб (RITUXAN®), представляющий собой химерное антитело к CD20.

Поскольку при В-клеточных лимфомах происходит экспрессия CD20, то этот антиген может служить в качестве "мишени для распознавания" таких лимфом. По существу, процесс "распознавания мишени" можно обобщить следующим образом: антитела, специфические в отношении поверхностного антигена CD20 на В-клетках, вводят пациенту. Эти антитела к CD20 специфически связываются с антигеном CD20 (очевидно) как на здоровых, так и на злокачественных В-клетках, и антитело к CD20, связанное с поверхностным антигеном CD20, может приводить к разрушению и истощению онкогенных В-клеток. Кроме того, с антителом к CD20 можно непосредственно или косвенным образом связывать химические агенты, цитотоксины или радиоактивные агенты, так что осуществляется избирательный "перенос" агента к В-клеткам, экспрессирующими антиген CD20. В обоих указанных подходах основной целью является разрушение опухоли. Конкретный подход может определяться выбором конкретного применяемого антитела к CD20. Таким образом, очевидно, что пригодные подходы для распознавания в качестве мишени антигена CD20 могут широко варьироваться.

Антитело ритуксимаб (RITUXAN®) представляет собой созданное с помощью генной инженерии химерное моноклональное антитело к человеческому антигену CD20, содержащее человеческую гамму 1-типа и мышью константную область. Это химерное антитело содержит человеческие константные области гамма 1-типа и в патенте US 5736137 (на имя Andersen и др.), выданном 17 апреля 1998 г., переданным IDEC Pharmaceuticals Corporation, обозначено как "C2B8". RITUXAN® разрешен для применения при лечении пациентов с CD20-позитивной В-клеточной рецидивной или рефрактерной низкозлокачественной или фолликулярной неходжкинской лимфомы. Исследования механизма действия *in vitro* позволили установить, что RITUXAN® обладает человеческой комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) (Reff и др., Blood, 83(2), 1994, с. 435-445). Кроме того, было установлено, что он обладает выраженной активностью в анализах по оценке антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC). Было установлено, что RITUXAN® обладает антитромиферативной активностью в анализах с использованием включения тимицина и ограниченной способностью непосредственно индуцировать апоптоз, в то время как антитела к CD20 не обладают такими свойствами (Maloney и др., Blood, 88(10), 1996, 637a).

#### Гликозилирование антител.

Компонент, представляющий собой олигосахарид, может оказывать существенное влияние на свойства, касающиеся эффективности гликопroteина, включая физическую стабильность, устойчивость к воздействию протеаз, взаимодействия с иммунной системой, фармакокинетические характеристики и специфическую биологическую активность. Такие свойства могут зависеть не только от присутствия или отсутствия олигосахаридов, но также и от их конкретных структур. Можно сделать некоторые общие выводы о связи структуры олигосахаридов и функцией гликопroteина. Например, некоторые олигосахаридные структуры опосредуют быстрый клиренс гликопroteина из кровотока в результате взаимодействий со специфическими связывающими углеводами белками, в то время как другие могут быть связаны с антителами и стимулировать нежелательные иммунные ответы (Jenkins и др., Nature Biotechnol., 14, 1996, с. 975-981).

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для производства имеющих терапевтическое значение гликопroteинов благодаря их способности гликозилировать белки с получением формы, наиболее совместимой с организмом человека (Cumming и др., Glycobiology, 1, 1991, с. 115-130; Jenkins и др., Nature Biotechnol., 14, 1996, с. 975-981). Бактерии очень редко гликозилируют белки и подобно другим типам обычно применяемых хозяев, таких как дрожжи, гифомицеты, клетки насекомых и растений, создают схемы гликозилирования, приводящие к быстрому клиренсу из кровотока, нежелательным иммунным взаимодействиям и в некоторых конкретных случаях к пониженной биологической активности. Среди клеток млекопитающих в последние двадцать лет наиболее часто используют клетки яичника китайского хомячка (СНО). Помимо пригодной схемы гликозилирования эти клетки позволяют постоянно получать генетически стабильные высокопродуктивные клони клеточных линий. Их можно культивировать до достижения высоких плотностей в простых биореакторах с использованием бессывороточных сред и их использование позволяет разрабатывать безопасные и воспроизводимые биологические процессы. К другим обычно применяемым клеткам животных относятся клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки мышевой миеломы линий NS0 и SP2/0. В последние годы изучали методы производства с использованием трансгенных животных (Jenkins и др., Nature Biotechnol., 14, 1996, с. 975-981).

Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях в константных областях тяжелых цепей, причем каждый изотип несет различный набор N-связанных углеводных структур, которые различным образом влияют на сборку белка, его секрецию или функциональную активность (Wright A. и Morrison S.L., Trends Biotechnol., 15, 1997, с. 26-32). Структура присоединенных N-связанных углеводов в значительной степени варьируется в зависимости от уровня процессинга и может включать имеющие высокое содержание маннозы, многократно разветвленные, а также биантенные комплексные олигосахариды (Wright A. и Morrison S.L., Trends Biotechnol., 15, 1997, с. 26-32). Как правило, имеет место гетерогенный процессинг коровых олигосахаридных структур, присоединенных в конкретном сайте гликозилирования, в результате чего даже моноклональные антитела обладают множеством гликоформ. Аналогично этому было установлено, что основные различия в гликозилировании антител имеют место между клеточными линиями и даже для данной клеточной линии, выращенной в различных условиях культивирования, можно обнаружить небольшие различия (Lifely M.R. и др., Glycobiology, 5(8), 1995, с. 813-822).

Одним из путей достижения значительного повышения эффективности при сохранении простого процесса производства и возможности избежать значительных нежелательных побочных действий является усиление природных опосредуемых клеткой эффекторных функций моноклональных антител путем конструирования олигосахаридного компонента согласно методу, описанному у Umana P. и др., Nature Biotechnol., 17, 1999, с. 176-180 и в патенте US 6602684, полное содержание которых включены в настоящее описание в качестве ссылки. Антитела IgG1-типа, представляющие собой антитела, наиболее часто используемые в иммунотерапии рака, являются гликопротеинами, которые имеют консервативный N-связанный сайт гликозилирования в положении Asn297 в каждом CH2-домене. Два комплексных биантенных олигосахарида, которые присоединены к Asn297, размещаются между CH2-доменами, образуя обширные контакты с каркасом полипептида и их наличие является существенным для способности антитела опосредовать эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность (ADCC) (Lifely M.R. и др., Glycobiology, 5, 1995, с. 813-822; Jefferis R. и др., Immunol. Rev., 163, 1998, с. 59-76; Wright A. и Morrison S.L., Trends Biotechnol., 15, 1997, с. 26-32).

Ранее авторы настоящего изобретения установили, что сверхэкспрессия в клетках яичника китайского хомячка (CHO)  $\beta$ (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III ("GnTIII"), гликозилтрансферазы, катализирующей образование бисекционных олигосахаридов, существенно повышает ADCC-активность *in vitro* антineйробластомного химерного моноклонального антитела (chCE7), продуцируемого сконструированными клетками CHO (Umafia P. и др., Nature Biotechnol., 17, 1999, с. 176-180; и публикацию международной заявки на патент WO 99/54342, полные содержания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки). Антитело chCE7 относится к большому классу неконьюгированных МАт, которые обладают высокой аффинностью и специфичностью в отношении опухоли, но имеют слишком малую эффективность для клинического применения при их продуцировании в стандартных клеточных линиях, в которых отсутствует фермент GnTIII (Umana P. и др., Nature Biotechnol., 17, 1999, с. 176-180). Это исследование было первым, в котором установлено, что существенные повышения ADCC-активности могут быть достигнуты путем конструирования продуцирующих антитело клеток, экспрессирующих GnTIII, что приводит также к увеличению содержания связанных с константной областью (Fc) бисекционных олигосахаридов, включая бисекционные нефукозилированные олигосахарида, превышающему уровни, присутствующие во встречающихся в естественных условиях антителах.

Таким образом, сохраняется необходимость разработки улучшенных терапевтических подходов к использованию в качестве мишени для распознавания антигена CD20 для лечения В-клеточных лимфом у приматов, включая человека (но не ограничиваясь им).

#### Краткое изложение сущности изобретения

Принимая во внимание чрезвычайно большой терапевтический потенциал антигенсвязывающих молекул (АСМ), которые обладают специфичностью связывания, присущей мышенному антителу B-Ly1, и у которых с помощью генной инженерии сконструирована схема гликозилирования с целью повышения аффинности к связыванию с Fc-рецептором и повышения эффекторной функции, при создании настоящего изобретения был разработан способ получения таких АСМ. Этот способ среди прочего позволяет получать рекомбинантные химерные антитела или их химерные фрагменты. Эффективность этих АСМ дополнительно повышают путем конструирования профиля гликозилирования Fc-области антитела.

Таким образом, данное изобретение относится к гуманизированному, подвергнутому гликоинженерингу антителу типа II к CD20, обладающему в результате этого гликоинженеринга повышенной ADCC и обладающему повышенной способностью индуцировать апоптоз клеток мишени в результате указанной гуманизации, где это антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую область, определяющую комплементарность (CDRs) B-Ly1 антитела мыши, где:

- (a) CDR1 тяжелой цепи является SEQ ID NO:16;
- (b) CDR2 тяжелой цепи является SEQ ID NO:26 и
- (c) CDR3 тяжелой цепи является SEQ ID NO:28,

причем области рамки считывания (FRs) FR1, FR2 и FR3 вариабельных областей тяжелой цепи ука-

занного антитела являются FR последовательностями человека, которые кодируются последовательностью VH1\_10 зародышевой линии человека, а вариабельная область FR4 тяжелой цепи указанного антитела кодируется последовательностью JH4 зародышевой линии человека, и:

- (d) CDR1 легкой цепи является SEQ ID NO:18;
- (e) CDR2 легкой цепи является SEQ ID NO:19 и
- (f) CDR3 легкой цепи является SEQ ID NO:20,

причем FR1, FR2 и FR3 вариабельных областей легкой цепи указанного антитела являются FR последовательностями человека, которые кодируются последовательностью VK\_2\_40 зародышевой линии человека, а вариабельная область FR4 легкой цепи указанного антитела кодируется последовательностью JK4 зародышевой линии человека.

Причем в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело включает Fc-область человека, которая была подвергнута гликоинженерингу для снижения количества остатков фукозы в N-связанном олигосахариде указанной Fc-области.

Кроме того, объектом данного изобретения является также гуманизированное антитело типа II к CD20, включающее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, включающую B-Ly1 CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:16; B-Ly1 CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:27 и B-Ly1 CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:28; области рамки считывания (FRs) FR1, FR2 и FR3, которые кодируются последовательностью VH1\_10 зародышевой линии человека и FR4 тяжелой цепи, которая кодируется последовательностью JH4 зародышевой линии человека;

(ii) вариабельную область легкой цепи, включающую B-Ly1 CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20 соответственно; FR1, FR2 и FR3 легкой цепи, которые кодируются последовательностью VH240 зародышевой линии человека и FR4 легкой цепи, которая кодируется последовательностью JK4 зародышевой линии, человека, где указанное антитело индуцирует высокие уровни апоптоза при инкубации с CD20-позитивными клетками человека по сравнению с контролем в идентичных условиях с использованием C2B8 химерного IgG1 антитела с последовательностью, идентичной ритуксимабу.

Другим объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая описанные выше антитела и фармацевтически приемлемый носитель, а также способ получения этих антител, который включает:

а) культивирование клетки-хозяина, включающей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий это антитело, в условиях позволяющих экспрессию указанного антитела;

б) выделение антитела.

Описанные в заявке антитела также пригодны для уничтожения CD20-экспрессирующих клеток лимфомы, причем этот способ включает введение в эти клетки антитела или фармацевтической композиции в количестве, достаточном для уничтожения указанных CD20-экспрессирующих клеток лимфомы, и для ингибирования роста клеток опухоли человека, путем введения в указанные клетки антитела или фармацевтической композиции в количестве, достаточном для ингибирования роста указанных клеток опухоли человека.

#### Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - нуклеотидная (SEQ ID NO:3) и аминокислотная (SEQ ID NO:1) последовательности V<sub>H</sub>-области мышиного B-Ly1;

на фиг. 2 - нуклеотидная (SEQ ID NO:4) и аминокислотная (SEQ ID NO:2) последовательности V<sub>L</sub>-области мышиного B-Ly1;

на фиг. 3 - связывание Rituximab® (O) и ch-B\_Ly1 (Δ) с CD20 на клетках B-лимфомы линии Raji;

на фиг. 4 - B-клеточное истощение, вызываемое Rituximab® (O) и ch-B\_Ly1 (Δ) в цельной крови трех различных классов генотипа Fc<sub>γ</sub>RIIIa-158V/F: (A) цельная кровь, полученная от F/F-донора, гомозиготная по рецептору с низкой аффинностью; (B) цельная кровь, полученная от F/V-донора, гетерозиготная по обладающему аффинностью рецептору; (B) цельная кровь, полученная от V/V-донора, гомозиготная по рецептору с высокой аффинностью;

на фиг. 5 - нуклеотидная (SEQ ID NO:11) и аминокислотная (SEQ ID NO:13) последовательности тяжелой цепи химерного антитела к CD20;

на фиг. 6 - нуклеотидная (SEQ ID NO:12) и аминокислотная (SEQ ID NO:14) последовательности легкой цепи химерного антитела к CD20;

на фиг. 7 - нуклеотидная и аминокислотная последовательности CDR мышиного антитела B-Ly1; (A) - предсказанные CDR V<sub>H</sub>-области, (B) - предсказанные CDR V<sub>L</sub>-области;

на фиг. 8 - MALDI-TOF-профиль химерного антитела B-Ly1, имеющего сконструированную схему гликозилирования; (A) - таблица, в которой представлены процентные содержания специфических пиков; (B) - спектр химерного B-Ly1, имеющего сконструированную схему гликозилирования; (B) - спектр химерного B-Ly1, имеющего сконструированную схему гликозилирования, после обработки Endo-H;

на фиг. 9 - данные о связывании различных гуманизированных антител к CD20 с В-клетками линии Raji. Различия между конструкцией B-HN2 и конструкциями B-HL8 и B-HL11 сосредоточены в каркасных участках 1 и 2, причем все три CDR являются идентичными. B-HL8 и B-HL11 имеют последовательности FR1 и FR2, выведенные из человеческой вариабельной области тяжелой цепи VH3, в то время как полный каркасный участок B-HN2 выведен из человеческой VH1. B-HL11 представляет собой производное B-HL8, имеющее одну мутацию Glu1Gln, где Gln представляет собой аминокислотный остаток в конструкции B-HN2. Это означает, что замена Glu1Gln не изменяет аффинность или интенсивность к связыванию. B-HN2 и B-HL8 различаются также 14 остатками FR, из которых один или несколько могут оказывать влияние на антигенсвязывающую способность рассматриваемого антитела;

на фиг. 10 - данные о связывании гуманизированного антитела к CD20 BHL4-KV1 с клетками-мишениями линии Raji. Конструкция BHL4 получена из антитела B-HN2 путем замены FR1 B-HN2 соответствующим участком последовательности VH1\_45 человеческой зародышевой линии. Эта конструкция характеризуется существенно более низкой антигенсвязывающей способностью несмотря на то, что она имеет отличные от исходной последовательности аминокислоты только в трех положениях в FR1. Эти остатки находятся в положениях 2, 14 и 30 (согласно нумерации Кэбота). Среди них наиболее сильное влияние, по-видимому, оказывает положение 30, поскольку оно является частью CDR1 согласно определению Хотиа (Chotia);

на фиг. 11 - сравнительные данные о связывающей способности B-HN1, B-HN2, B-HN3 и родительского антитела B-Ly1. Из представленных данных видно, что все At характеризуются близкими значениями EC<sub>50</sub>, но конструкция B-HN1 связывается с более низкой интенсивностью/стехиометрией, чем варианты B-HN2 и B-HN3. B-HN1 отличается от B-HN2 и B-HN3 своими частично человеческими участками CDR1 и CDR2 (согласно определению Кэбота), а также полиморфизмом Ala/Thr в положении 28 (согласно нумерации Кэбота). Это указывает на то, что положение 28, полный CDR1 и/или полный CDR2 важны для взаимодействия антитела/антитела;

на фиг. 12 - сравнительные данные для B-HL1, B-HN1 и родительского антитела B-Ly1. Данные свидетельствуют о том, что конструкция B-HL1 совсем не обладает связывающей активностью, а связывающая интенсивность/стехиометрия B-HN1 примерно в два раза меньше, чем B-Ly1. Как B-HL1, так и B-HN1 сконструированы на основе акцепторных каркасов, выведенных из вариабельных областей человеческой тяжелой цепи VH1-класса. Среди других различий наиболее значительным является различие в положении 71 (согласно нумерации Кэбота) конструкции B-HL1, что свидетельствует о его возможном важном значении для связывания с антигеном;

на фиг. 13 - флуороцитометрический анализ антигенсвязывающей способности антитела к CD20. Данные свидетельствуют о том, что конструкции B-HL2 и B-HL3 не обладают CD-20-связывающей активностью;

на фиг. 14 - данные об апоптозе моноклональных клеток (MCL) линии Z-138, индуцируемом антителом к CD20;

на фиг. 15 - данные об апоптозе, индуцируемом антителом к CD20. Детали анализа: высевали  $5 \times 10^5$  клеток/лунку в 24-луночные планшеты ( $5 \times 10^5$  клеток/мл) в культуральную среду. В лунки добавляли 10 мг соответствующего At, ЗФР в качестве негативного контроля или 5 мМ камптомотецин (CPT) в качестве позитивного контроля. Образцы инкубировали в течение ночи (16 ч), окрашивали с помощью AnnV-ФИТЦ и анализировали с помощью FACS. Анализ осуществляли в 3-х повторностях. (\*): вычитали сигнал, соответствующий только ЗФР (применение только ЗФР приводило к появлению 8% и 2% AnnV+ для PR-1- и Z-138-клеток соответственно). Использовали следующие антитела: C2B8 (химерное, не имеющее сконструированную схему гликозилирования; BHN2-KV1 (гуманизированное, не имеющее сконструированную схему гликозилирования). Примечание: в этом анализе не применяли какие-либо дополнительные эффекторные клетки, а только клетки-мишени плюс антитело или контроли;

на фиг. 16 - данные об уничтожении клетки-мишени антителами к CD20 с помощью иммунокомпетентных эффекторных клеток. Детали анализа: В-клеточное "истощение" в цельной крови здоровых доноров осуществляли путем инкубации в течение ночи и анализировали в отношении CD19+/CD3+ с помощью FACS. ADCC оценивали с использованием PBMC в качестве эффекторов, инкубация в течение 4 ч, соотношение эффектора: мишени 25:1, уничтожение клеток-мишени оценивали по удерживанию кальцеина по сравнению с лизисом с помощью детергента (100%) и с лизисом без At (0%). Применяемые антитела: C2B8 (химерная, не имеющая сконструированную схему гликозилирования форма); BHN2-KV1-wt (гуманизированная, не имеющая сконструированную схему гликозилирования форма BHN2-KV1); BHN2-KV1-GE (гуманизированная, имеющая сконструированную схему гликозилирования форма антитела BHN2-KV1);

на фиг. 17 - MALDI/TOF-МС-профиль выделившихся после обработки PNG-азой-F Fc-олигосахаридов (олигосахаридов из Fc-области) немодифицированных, не имеющих сконструированную схему гликозилирования гуманизированного IgG1 B-ly1 антитела к человеческому CD20, BHN2-KV1;

на фиг. 18 - MALDI/TOF-МС-профиль выделившихся после обработки PNG-азой-F Fc-олигосахаридов, имеющих сконструированную схему гликозилирования гуманизированного IgG1 B-ly1

антитела к человеческому CD20, ВНН2-KV1g1. Конструирование схемы гликозилирования осуществляли путем совместной экспрессии в клетках-хозяевах генов антител и гена, кодирующего фермент с катализитической активностью  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III);

на фиг. 19 - MALDI/TOF-МС-профиль выделившихся после обработки PNG-азой-F Fc-олигосахаридов, имеющих сконструированную схему гликозилирования гуманизированного IgG1 B-ly1 антитела к человеческому CD20, ВНН2-KV1g2. Конструирование схемы гликозилирования осуществляли путем совместной экспрессии в клетках-хозяевах генов антител и генов, кодирующих фермент с катализитической активностью  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III) и кодирующих фермент с каталитической активностью  $\alpha$ -маннозидазы II комплекса Гольджи;

на фиг. 20 - данные о связывании не имеющих сконструированную схему гликозилирования и имеющих сконструированную схему гликозилирования антител к человеческому Fc<sub>γ</sub>IIIa-рецептору, находящемуся на поверхности рекомбинантных CHO-CD16-клеток;

на фиг. 21- данные об апоптозе не имеющих сконструированную Fc-область и имеющих сконструированную Fc-область антител к CD20 на моноклональных клетках линии Z-138. Детали анализа: высевали  $5 \times 10^5$  клеток/лунку в 24-луночные планшеты ( $5 \times 10^5$  клеток/мл) в культуральной среде. В лунки добавляли 10 мг соответствующего At, ЗФР в качестве негативного контроля. Образцы инкубировали в течение ночи (16 ч), окрашивали с помощью AnnV-ФИТЦ и анализировали с помощью FACS. Анализ осуществляли в 3 повторностях. Применяемые At: C2B8 = ритуксимаб (химерная не имеющая сконструированную схему гликозилирования форма, аналогичная поступающей в продажу форме; ВНН2-KV1 (гуманизированное не имеющее сконструированную схему гликозилирования (см. на фиг. 6 профиль гликозилирования); ВНН2-KV1g1 (гуманизированное имеющее сконструированную схему гликозилирования (см. на фиг. 7 профиль гликозилирования); ВНН2-KV1g2 (гуманизированное не имеющее сконструированную схему гликозилирования (см. на фиг. 8 профиль гликозилирования). Примечание: в этом анализе не применяли какие-либо дополнительные эффекторные клетки, а только клетки-мишени плюс антитело или контроли. (\*): Вычитали сигнал, соответствующий только ЗФР.

#### Подробное описание изобретения

Понятия, применяемые в контексте настоящего описания, соответствуют общепринятым в данной области, если не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" относится к полным молекулам антител, включая моноклональные, поликлональные и мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, а также фрагменты антител, которые имеют Fc-область и сохраняют специфичность связывания, и к сливным белкам, которые включают область, эквивалентную Fc-области иммуноглобулина и которые сохраняют специфичность связывания. Под понятие подпадают гуманизированные, приматизированные и химерные антитела.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-область" относится к С-концевой области тяжелой цепи IgG. Хотя примыкающие к Fc-области участки тяжелой цепи IgG могут слегка различаться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG, как правило, представляет собой участок цепи от аминокислоты Cys226 до карбоксильного конца.

В контексте настоящего описания понятие "область, эквивалентная Fc-области иммуноглобулина" относится к встречающимся в естественных условиях аллельным вариантам Fc-области иммуноглобулина, а также вариантам, имеющим изменения, которые получают в результате замен, добавлений или делеций, но которые не снижают в значительной степени способность иммуноглобулина опосредовать эффекторные функции (такие как антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность). Например, одну или несколько аминокислот можно изымать путем делеции из N-конца или С-конца Fc-области иммуноглобулина без существенного снижения биологической функции. Такие варианты можно отбирать согласно общим правилам, которые известны в данной области, так, чтобы оказывать минимальное воздействие на активность (см., например, Bowie J.U. и др., *Science* 247, 1990, с. 1306-1310).

В контексте настоящего описания понятие "антителосвязывающая молекула" в наиболее широком смысле относится к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. Более конкретно понятие "антителосвязывающая молекула, которая связывает CD20" обозначает молекулу, которая специфически связывается с находящимся на клеточной поверхности негликозилированным фосфопротеином с молекулярной массой 35000 Да, который обычно называют консервативным дифференцировочным антигеном человеческих В-лимфоцитов Вр35, который, как правило, называют CD20. Понятие "специфически связывается" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий.

В контексте настоящего описания понятия "сливный" и "химерный" касательно полипептидов, таких как ACM относится к полипептидам, которые содержат аминокислотные последовательности, выведененные из двух или большего количества гетерологичных полипептидов, таких как фрагменты антител из различных видов. Для химерных ACM, например, несвязывающие антиген компоненты можно получать из широкого разнообразия видов, включая приматов, таких как шимпанзе и люди. Константная область химерной ACM наиболее предпочтительно является практически идентичной константной области

встречающего в естественных условиях человеческого антитела; вариабельная область химерного антитела наиболее предпочтительно практически идентична вариабельной области рекомбинантного антитела к CD-20, которое имеет аминокислотную последовательность вариабельной области мышиного антитела B-Ly1. Гуманизированные антитела являются наиболее предпочтительной формой слитого или химерного антитела.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид, обладающий "GnTIII-активностью" относится к полипептидам, которые обладают способностью катализировать добавление остатка N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в  $\beta$ -1-4-связи к  $\beta$ -связанному маннозиду триманнозильного ядра N-связанных олигосахаридов. Понятие относится к слитым полипептидам, которые обладают ферментативной активностью подобной, но не обязательно идентичной, активности  $\beta$ (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, также известной под названием  $\beta$ -1,4-маннозилгликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза (КФ 2.4.1.144) согласно номенклатуре Комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)), при оценке с помощью конкретного биологического анализа как в случае зависимости от дозы, так и без зависимости от дозы. В случае, когда существует зависимость от дозы, фермент не обязательно должен быть идентичен GnTIII, а скорее должен быть практически подобен в отношении зависимости данной активности от дозы по сравнению с GnTIII (т.е. полипептид "кандидат" должен обладать более высокой активностью или не более чем примерно в 25 раз пониженной активностью, предпочтительно не более чем примерно в 10 раз пониженной активностью, и еще более предпочтительно не более чем примерно в 3 раза пониженной активностью по сравнению с GnTIII.)

В контексте настоящего описания понятие "вариант" (или "аналог") относится к полипептиду, который отличается от конкретного указанного полипептида, предлагаемого в изобретении, наличием аминокислотных инсерций, делеций и замен, созданных, например, с помощью метода рекомбинантной ДНК. Варианты ACM, предлагаемые в настоящем изобретении, включают химерные, приматизированные или гуманизированные антигенсвязывающие молекулы, в которых один или несколько аминокислотных остатков модифицированы путем замены, добавления и/или делеций таким образом, что это не оказывает существенного воздействие на аффинность связывания с антигеном (например, CD20). Для решения вопроса о том, какие аминокислотные остатки можно заменять, добавлять или удалять без снижения представляющих интерес видов активности, можно осуществлять сравнение последовательности конкретного полипептида с последовательностью гомологичных пептидов, и минимизируя количество замен в аминокислотной последовательности в областях высокой гомологии (консервативные области), или путем замены аминокислот консенсусной последовательностью.

В другом случае рекомбинантные варианты, кодирующие эти же или подобные полипептиды, можно синтезировать или отбирать на основе "избыточности" генетического кода. Различные замены кодонов, такие как "молчание" замены, которые приводят к получению различных сайтов рестрикции, можно интродуцировать с целью оптимизации клонирования в плазмидном или вирусном векторе или экспрессии в конкретной прокариотической или эукариотической системе. Мутации в полинуклеотидной последовательности могут проявляться в полипептиде или доменах других пептидов, добавленных к полипептиду для модификации свойств любого фрагмента полипептида с целью изменения характеристик, таких как аффинность к связыванию лиганда, внутрицепочечная аффинность или скорость расщепления/обновления.

Предпочтительно аминокислотные "замены" являются результатом замены одной аминокислоты другой аминокислотой, которая имеет сходные структурные и/или химические свойства, т.е. консервативные аминокислотные замены. "Консервативные" аминокислотные замены можно создавать на основе сходства в полярности, заряде, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы участвующих в этом остатков. Например, к неполярным (гидрофобным) аминокислотам относятся аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; к полярным нейтральным аминокислотам относятся глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; к положительно заряженным (основным) аминокислотам относятся аргинин, лизин и гистидин; и к отрицательно заряженным (кислотным) аминокислотам относятся аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. "Инсерции" или "делеции" предпочтительно затрагивают примерно 1-20 аминокислот, более предпочтительно 1-10 аминокислот. Приемлемую вариацию можно определять экспериментально, создавая систематически инсерции, делеции или замены аминокислот в полипептидной молекуле с помощью методов рекомбинантной ДНК и анализируя активность полученных рекомбинантных вариантов.

В контексте настоящего описания понятие "гуманизированный" относится к антигенсвязывающей молекуле, полученной из антигенсвязывающей молекулы из организма, кроме человека, например к мышенному антителу, которая сохраняет или практически сохраняет антигенсвязывающие свойства родительской молекулы, но которая является менее иммуногенной для людей. Это можно достигать с помощью различных методов, которые включают (а) трансплантацию полных нечеловеческих вариабельных областей в человеческие константные области с получением химерных антител, (б) трансплантацию нечеловеческих CDR в человеческие каркасные и константные области с сохранением имеющих решающее

значение остатков каркасного участка (например, остатков, важных для сохранения хорошей аффинности к связыванию антигена или функций антитела) или без их сохранения, или (в) трансплантацию полных нечеловеческих вариабельных областей, но с их "маскировкой" участком, напоминающим человеческий, путем замены находящихся на поверхности остатков. Такие методы описаны у Jones и др., Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 1984, с. 6851-6855; Morrison и Oi, Adv. Immunol., 44, 1988, с. 65-92; Verhoeven и др., Science, 239, 1988, с. 1534-1536; Padlan, Molec. Immunol., 28, 1991, с. 489-498; Padlan, Molec. Immun., 31(3), 1994, с. 169-217, все указанные публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. В каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела присутствует 3 гипервариабельных участка или CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), которые фланкированы четырьмя каркасными подобластями (участками) (т.е. FR1, FR2, FR3 и FR4) в каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Обсуждение гуманизированных антител представлено среди прочего в U.S. 6632927 и в опубликованной заявке на патент США № 2003/0175269, оба документа полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Аналогично этому, в контексте настоящего описания понятие "приматизированный" относится к антигенсвязывающей молекуле, полученной из антигенсвязывающей молекулы организма, кроме примата, например мышенному антителу, которая сохраняет или практически сохраняет антигенсвязывающие свойства родительской молекулы, но которая является менее иммуногенной для приматов.

В случае, когда в данной области применяют и/или являются приемлемыми два или более определений понятия, то в контексте настоящего описания подразумевается, что применяемое определение включает все такие значения, если специально не указано иное. Конкретным примером является применение понятия "гипервариабельный участок" ("CDR") для описания не соприкасающихся антигенсвязывающих центров, присутствующих в полипептидах вариабельной области как тяжелой, так и легкой цепи. Этот конкретный участок описан у Kabat и др., "Sequences Proteins of Immunological Interest", изд-во U.S. Dept. of Health and Human Services, (1983) и Chothia и др., J. Mol. Biol. 196, 1987, с. 901-917, публикации включены в настоящее описание в качестве ссылки, причем, эти определения относятся к перекрывающимся аминокислотным остаткам или поднаборам аминокислотных остатков, при их сравнении друг с другом. Однако в контексте настоящего описания подразумевается возможность применения любого определения к CDR антитела или его вариантов. Соответствующие аминокислотные остатки, из которых состоят CDR, как они определены в каждой из процитированных выше ссылок, представлены в сравнении ниже в табл. 1. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, должны варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области легко могут определить, какие остатки входят в конкретный CDR, на основе данных о аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Таблица 1

Определения CDR<sup>1</sup>

	Кэбот	Хотиа	ACM
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	

<sup>1</sup>Нумерация всех входящих в CDR остатков в табл. 1 дана в соответствии с нумерацией, предложенной Кэботом и др. (см. ниже).

Кэбот и др. предложили также систему нумерации последовательностей вариабельных областей, которую можно применять для любого антитела.

Обычный специалист в данной области может однозначно применять эту систему "нумерации по Кэботу" для последовательности любой вариабельной области, не имея никаких экспериментальных данных, кроме сведений о самой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нумерация по Кэботу" относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", изд-во U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983. Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в ACM даны в соответствии с системой нумерации по Кэботу. Нумерация в последовательностях, представленных в перечне последовательностей (т.е. SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:78) не соответствует системе нумерации по Кэботу.

В контексте настоящего описания понятие "нуклеиновая кислота или полинуклеотид, имеющие нуклеотидную последовательность по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, с которой проводят сравнение (референс-последовательность)" означает, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности, за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точковых мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, можно изымать путем

делеции или заменять другими нуклеотидами вплоть до 5% нуклеотидов референс-последовательности или вплоть до 5% от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эталонная последовательность может представлять собой полную последовательность, представленную на фиг. 24 или 25.

С практической точки зрения определять являются ли любая конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными нуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно с помощью известных широко используемых компьютерных программ. В качестве предпочтительного метода для определения наилучшего общего совпадения эталонной последовательности (последовательность, предлагаемая в настоящем изобретении) и анализируемой последовательности, который также обозначают как метод глобального сравнительного анализа последовательности, можно использовать компьютерную программу FASTDB, основанную на алгоритме Brutlag и др., Comp. App. Biosci. 6, 1990, с. 237-245. При сравнительном анализе последовательностей как эталонная, так и анализируемая последовательности обе представляют собой последовательности ДНК. Последовательности РНК можно сравнивать путем замены остатков U на T. Результатом указанного глобального сравнительного анализа последовательностей является процент идентичности. Предпочтительными параметрами для расчета процента идентичности, используемыми в программе FASTDB сравнительного анализа последовательностей ДНК, являются: матрица=унитарная, k-запись в базе данных=4, штраф за несовпадение=1, штраф за присоединение =30, длина рандомизированной группы =0, балл за срезание=1, штраф за брешь=5, штраф за размер бреши 0,05, размер окна=500 или длина анализируемой нуклеотидной последовательности, если она короче.

Если анализируемая последовательность короче эталонной последовательности вследствие наличия делеций на 5'- или 3'-конце, но не вследствие внутренних делеций, то результаты можно скорректировать вручную. Это обусловлено тем, что программа FASTDB не учитывает укорочения на 5'- и 3'-конце анализируемой последовательности при расчете процента идентичности. Для анализируемых последовательностей, укороченных на 5'- или 3'-концах по отношению к эталонной последовательности процент идентичности корректируют путем вычисления количества оснований эталонной последовательности, расположенных за 5'- и 3'-концами анализируемой последовательности, которые не совпали/не проанализированы, в виде процента от общего количества оснований эталонной последовательности. Совпадают ли/проанализированы ли нуклеотиды, определяется результатами сравнительного анализа последовательностей с помощью программы FASTDB. Затем этот процент вычитают из процента идентичности, рассчитанного с помощью указанной выше программы FASTDB с использованием указанных заданных параметров, в результате чего получают окончательную оценку процента идентичности. Эту скорректированную оценку используют для целей настоящего изобретения. Для целей ручной коррекции оценки процента идентичности рассчитывают только основания, расположенные за 5'- и 3'-концами анализируемой последовательности, выявленные с помощью сравнительного анализа с использованием программы FASTDB, которые не совпадали/не проанализированы с эталонной последовательностью.

Например, для определения процента идентичности анализируемую последовательность длиной 90 оснований сравнивают с эталонной последовательностью длиной 100 оснований. На 5'-конце анализируемой последовательности имеются делеции и поэтому сравнительный анализ с помощью FASTDB не позволяет устанавливать совпадения/анализировать 10 первых оснований на 5'-конце. 10 неспаренных оснований представляют собой 10% последовательности (количество несовпадавших оснований на 5'- и 3'-концах/общее количество оснований в эталонной последовательности), таким образом 10% вычитают из оценки процента идентичности, рассчитанного с помощью программы FASTDB. Если остальные 90 оснований идеально совпадают, то окончательный процент идентичности составляет 90%. В другом примере анализируемую последовательность длиной 90 оснований сравнивают с эталонной последовательностью длиной 100 оснований. В данном случае делеции представляют собой внутренние делеции, так что на 5'- или 3'-конце анализируемой последовательности не имеется оснований, которые не совпадали/не проанализированы с эталоном. В этом случае процент идентичности, рассчитанный с помощью программы FASTDB, не корректируют вручную. Еще раз следует подчеркнуть, что вручную осуществляют коррекцию только для оснований, которые не совпали/не проанализированы на 5'- и 3'-концах анализируемой последовательности. Для целей настоящего изобретения не проводят никаких других коррекций.

Подразумевается, что у полипептида, имеющего аминокислотную последовательность по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" эталонной аминокислотной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, аминокислотная последовательность идентична эталонной последовательности, за исключением того, что анализируемая последовательность полипептида может иметь вплоть до пяти аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот эталонной последовательности. Другими словами для того, чтобы получить полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична эталонной аминокислотной последовательности, можно встраивать, изымать путем делеции или заменять другой аминокислотой вплоть до 5% аминокислотных остатков анализируемой последовательности. Эти изменения по сравнению с референс-последовательностью могут иметь

место в N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом положении между этими концами, в виде изменений, либо распределенных индивидуально между остатками референс-последовательности, либо в виде одной или нескольких непрерывных групп в референс-последовательности.

С практической точки зрения определять является ли любой конкретный полипептид по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным референс-полипептиду, можно с помощью известных широко используемых компьютерных программ. В качестве предпочтительного метода для определения наилучшего общего совпадения эталонной последовательности (последовательность, предлагаемая в настоящем изобретении) и анализируемой последовательности, который также обозначают как метод глобального сравнительного анализа последовательности, можно использовать компьютерную программу FASTDB, основанную на алгоритме Brutlag и др., Comp. App. Biosci. 6, 1990, с. 237-245. При сравнительном анализе последовательностей как эталонная, так и анализируемая последовательности либо обе представляют собой нуклеотидные последовательности, либо обе представляют собой аминокислотные последовательности. Результатом указанного глобального сравнительного анализа последовательностей является процент идентичности. Предпочтительными параметрами, используемыми в программе FASTDB сравнительного анализа аминокислотных последовательностей для расчета процента идентичности, являются: матрица=PAM 0, k-запись в базе данных=2, штраф за несовпадение=1, штраф за присоединение =20, длина рандомизированной группы =0, балл за срезание=1, размер окна=длина последовательности, штраф за брешь=5, штраф за размер бреши 0,05, размер окна=500 или длина анализируемой аминокислотной последовательности, если она короче.

Если анализируемая последовательность короче эталонной последовательности вследствие наличия делеций на N'- или C'-конце, но не вследствие внутренних делеций, то результаты можно скорректировать вручную. Это обусловлено тем, что программа FASTDB не учитывает укорочения на N'- и C'-конце при расчете процента идентичности. Для анализируемых последовательностей, укороченных на N'- или C'-концах по отношению к эталонной последовательности процент идентичности корректируют путем вычисления количества остатков эталонной последовательности, выступающих за N'- и C'-концы анализируемой последовательности, которые не совпали/не проанализированы, в виде процента от общего количества оснований эталонной последовательности. Совпадают ли остатки при сравнительном анализе, определяется результатами сравнительного анализа последовательностей с помощью программы FASTDB. Затем этот процент вычитают из процента идентичности, рассчитанного с помощью указанной выше программы FASTDB с использованием указанных параметров, в результате чего получают окончательную оценку процента идентичности. Эту скорректированную оценку используют для целей настоящего изобретения. Для целей ручной коррекции оценки процента идентичности рассчитывают только остатки, расположенные за N'- и C'-концами анализируемой последовательности, выявленные с помощью сравнительного анализа с использованием программы FASTDB, которые не совпадают при сравнительном анализе с эталонной последовательностью. Т.е. учитывают только положения эталонных остатков вне наиболее удаленных N- и C-концевых остатков анализируемой последовательности.

Например, для определения процента идентичности анализируемую аминокислотную последовательность, содержащую 90 остатков, сравнивают с эталонной последовательностью, содержащей 100 остатков. На N'-конце анализируемой последовательности имеются делеции и поэтому сравнительный анализ с помощью FASTDB не позволяет устанавливать совпадения при сравнительном анализе для 10 первых остатков на N'-конце. 10 несовпавших остатков представляют собой 10% последовательности (количество несовпавших остатков на N'- и C'-концах/общее количество остатков в эталонной последовательности), таким образом, 10% вычитают из оценки процента идентичности, рассчитанного с помощью программы FASTDB. Если остальные 90 остатков идеально совпадают, то окончательный процент идентичности составляет 90%. В другом примере анализируемую последовательность, содержащую 90 остатков, сравнивают с эталонной последовательностью, содержащей 100 остатков. В данном случае делеции представляют собой внутренние делеции, так что на N'- или C'-конце анализируемой последовательности не имеется остатков, которые не совпадают при сравнительной анализе с эталоном. В этом случае процент идентичности, рассчитанный с помощью программы FASTDB, не корректируют вручную. Еще раз следует подчеркнуть, что вручную осуществляют коррекцию только для несовпавших/не проанализированных остатков на N'- и C'-концах анализируемой последовательности. Для целей настоящего изобретения не проводят никаких других коррекций.

В контексте настоящего описания понятие "нуклеиновая кислота, которая "гибридизуется в строгих условиях" с нуклеотидной последовательностью, предлагаемой в изобретении, относится к полинуклеотиду, который гибридизуется при инкубации в течение ночи при 42°C в растворе, содержащем 50% формамида, 5×SSC (750 mM NaCl, 75 mM цитрат натрия), 50 mM фосфат натрия (pH 7,6), 5× раствор Денхардта, 10% сульфата декстрана и 20 мкг/мл недатурированной, гидродинамически фрагментированной ДНК из спермы лосося, с последующей отмыvkой фильтров в 0,1×SSC примерно при 65°C.

В контексте настоящего описания понятие "домен локализации в комплексе Гольджи" относится к аминокислотной последовательности расположенного в комплексе Гольджи полипептида, который от-

ветствен за "заякоривание" полипептида в области внутри комплекса Гольджи. Как правило, домены локализации содержат аминоконцевые "хвосты" фермента.

В контексте настоящего описания понятие "эффекторная функция" относится к видам биологической активности, присущим Fc-области (нативная последовательность Fc-области или аминокислотная последовательность варианта Fc-области) антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются (но не ограничиваясь ими) аффинность к связыванию с Fc-рецептором, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности и т.д.

В контексте настоящего описания понятие "конструкция", "сконструированный (созданный)", "конструирование (создание)" и "сконструированная схема гликозилирования" относятся к любой манипуляции, которой подвергают схему гликозилирования встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Конструирование схемы гликозилирования включает метаболическое конструирование механизма гликозилирования клетки, в том числе генетические манипуляции, касающиеся путей олигосахаридного синтеза, с целью получения измененного гликозилирования гликопротеинов, экспрессируемых в клетках. Кроме того, конструирование схемы гликозилирования включает воздействия мутаций и клеточного окружения на гликозилирование.

В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любой клеточной системе, которую можно сконструировать для производства полипептидов и антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения клетку-хозяина конструируют так, чтобы с ее помощью получать антигенсвязывающую молекулу с модифицированными гликоформами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, фрагмент антитела или слитый белок. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергали дополнительным манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих GnTIII-активностью. Клетки-хозяева представляют собой культивируемые клетки, например культивируемые клетки млекопитающих, такие как СНО-клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышиной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и растительные клетки, а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" относится к антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и клеточнозависимой, опосредованной растворимым слитым с Fc белком, который содержит человеческую Fc-область. Это представляет собой механизм иммунитета, приводящий к лизису "меченых антителом клеток" "человеческими иммунокомпетентными эффекторными клетками", где

понятие ""человеческие иммунокомпетентные эффекторные клетки" означает популяцию лейкоцитов, несущих на поверхности Fc-рецепторы, с помощью которых они связываются с Fc-областью антител или слитыми с Fc белками и осуществляют эффекторные функции. Такая популяция может включать (но не ограничиваясь ими) периферические мононуклеарные клетки (PBMC) и/или естественные клетки-киллеры (NK);

понятие "меченные антителом клетки" относится к клеткам, которые связаны с антителами или слитыми с Fc белками. Антитела или слитые с Fc белки связываются с клетками-мишениями посредством N-концевого по отношению к Fc-области фрагмента белка.

В контексте настоящего описания понятие "повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" относится к любому увеличению количества "меченых антителом клеток", подвергнутых лизису в данный момент времени при данной концентрации антитела или слитого с Fc белка, в среде, окружающей клетки-мишени, с помощью указанного выше механизма Fc-опосредованной клеточнозависимой цитотоксичности и/или снижению концентрации антитела или слитого с Fc белка в среде, окружающей клетки-мишени, необходимой для лизиса данного количества "меченых антителом клеток" в данный момент времени с помощью механизма Fc-опосредованной клеточнозависимой цитотоксичности. Понятие "повышение уровня Fc-опосредованной клеточнозависимой цитотоксичности" оценивают относительно клеточнозависимой цитотоксичности, опосредованной одним и тем же антителом или слитым с Fc белком, продуцированным в одном и том же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но которое не продуцировалось клеткой-хозяином, сконструированной для экспрессии гликозилтрансферазы GnTIII с помощью способов, представленных в настоящем описании.

Понятие "антитело, обладающее повышенной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC)" означает антитело, как оно определено выше, которое обладает повышенной ADCC при определении с помощью любого приемлемого метода, известного обычным специалистам в данной области. Один из приемлемых методов анализа *in vitro* ADCC заключается в том, что:

- 1) для анализа применяют клетки-мишени, для которых известно, что они экспрессируют антиген-

мишень, распознаваемый антигенсвязывающим центром антитела;

2) для анализа в качестве эффекторных клеток используют человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), выделенные из крови произвольно выбранных здоровых доноров;

3) анализ осуществляют с помощью следующего протокола:

I) PBMC выделяют с помощью стандартных методов центрифугирования в градиенте плотности и сусpendingируют  $5 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI-среде для культуры клеток;

II) выращивают клетки-мишени с помощью стандартных методов культуры тканей, собирают на экспоненциальной фазе роста, когда жизнеспособность составляет более 90%, промывают в RPMI-среде для культуры клеток, меченной 100 мкКи  $^{51}\text{Cr}$ , дважды промывают с помощью среды для культуры клеток и ресуспенсионируют в среде для культуры клеток с плотностью  $10^5$  клеток/мл;

III) переносят по 100 мкл указанной выше конечной супензии клеток-мишени в каждую лунку 96-луночного титрационного микропланшета;

IV) готовят серийные разведения с концентрацией антител от 4000 до 0,04 нг/мл в среде для культуры клеток и добавляют 50 мкл образовавшихся растворов антител к клеткам-мишениям в 96-луночном титрационном микропланшете, оценивая в трех повторностях различные концентрации антител во всем указанном выше диапазоне концентраций;

V) для создания контролей с максимальным высвобождением (MR) используют 3 дополнительные лунки в планшете, которые содержат меченные клетки-мишени, с добавлением 50 мкл 2 об.% водного раствора неионогенного детергента (Nonidet, фирма Sigma, Сент-Луис), вместо раствора антитела (указанного в п. IV, выше);

VI) для создания контролей со спонтанным высвобождением (SR), используют 3 дополнительные лунки в планшете, которые содержат меченные клетки-мишени, с добавлением 50 мкл RPMI-среды для культуры клеток вместо раствора антитела (указанного в п. IV, выше);

VII) затем 96-луночный титрационный микропланшет центрифугируют при 50×g в течение 1 мин и инкубируют в течение 1 ч при 4°C;

VIII) добавляют в каждую лунку по 50 мкл супензии PBMC (указанной в п. I, выше), получая соотношение эффекторная клетка: клетка-мишень 25:1, и планшеты помещают в инкубатор в атмосферу 5% CO<sub>2</sub> и выдерживают при 37°C в течение 4 ч;

IX) собирают бесклеточный супернатант из каждой лунки и количественно оценивают выделенную в процессе эксперимента радиоактивность (ER) с помощью счетчика гамма-лучей;

X) рассчитывают процент специфического лизиса для каждой концентрации антитела согласно формуле (ER-MR)/(MR-SR)×100, где ER обозначает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для указанной концентрации антитела, MR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для MR-контролей (см. п. V, выше), а SR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для SR-контролей (см. п. VI, выше);

4) "повышенную ADCC" определяют либо как увеличение максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций антитела, и/или как снижение концентрации антитела, необходимой для достижения  $1/2$  максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций антитела. Повышение ADCC оценивают относительно ADCC, опосредованной одним и тем же антителом, продуцированным в одном и том же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но которое не продуцировалось клеткой-хозяином, сконструированной для сверхэкспрессии GnTIII.

Один из объектов настоящего изобретения относится к антигенсвязывающим молекулам, обладающим специфичностью связывания, соответствующей специфичности мышиного антитела B-Ly1, и он основан на установленном при создании изобретения факте, что их эффекторные функции можно усиливать путем изменения гликозилирования. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой химерное антитело. Предпочтительным вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, которые содержат CDR, представленные на фиг. 7. В частности, предпочтительным вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, который содержит (а) последовательность, выбранную из ряда, включающего SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7 (CDR V<sub>H-1</sub>); и (б) последовательность, выбранную из группы, включающей: SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 (CDR V<sub>H-2</sub>) и SEQ ID NO:24. Другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, который содержит SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO:10 (CDR V<sub>L</sub>). Согласно одному из вариантов осуществления изобретения все эти полинуклеотиды кодируют слитый полипептид.

Согласно другому варианту осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула содержит V<sub>H</sub>-область мышиного антитела B-Ly1, представленную на фиг. 1, или ее вариант; и немышиный полипептид. Следующим предпочтительным вариантом осуществления изобретения является антигенсвязывающая молекула, которая содержит V<sub>L</sub>-область мышиного антитела B-Ly1, представленную на фиг. 2, или ее вариант; и немышиный полипептид.

Еще одним объектом изобретения являются антигенсвязывающие молекулы, которые содержат один или несколько укороченных CDR антитела BLy-1. Такие укороченные CDR должны содержать, как минимум, определяющие специфичность аминокислотные остатки данного CDR. Под "определяющим специфичность остатком" понимают остатки, которые непосредственно участвуют во взаимодействии с антигеном. В целом, только от 1/5 до 1/3 остатков в данном CDR принимает участие в связывании с антигеном. Определяющие специфичность остатки в каждом конкретном CDR можно идентифицировать, например, путем вычисления внутриатомных контактов на трехмерной модели структуры и определения вариабельности последовательности в данном положении остатков согласно методу, описанному у Padlan и др., FASEB J. 9(1), 1995, с. 133-139, содержание публикации полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Таким образом, изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, который содержит по меньшей мере один гипервариабельный участок мышиного антитела B-Ly1 или его вариант или укороченную форму, которые содержат по меньшей мере определяющие специфичность остатки указанного гипервариабельного участка, где выделенный полинуклеотид кодирует слитый полипептид. Предпочтительно указанные выделенные полинуклеотиды кодируют слитый полипептид, который представляет собой антигенсвязывающую молекулу. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения полинуклеотид несет три гипервариабельных участка мышиного антитела B-Ly1 или их варианты или укороченные формы, содержащие, по меньшей мере, определяющие специфичность остатки каждого из трех гипервариабельных участков. Согласно другому варианту осуществления изобретения полинуклеотид кодирует полную вариабельную область легкой или тяжелой цепи химерного (например, гуманизированного) антитела. Изобретение относится также к полипептидам, кодируемым указанными полинуклеотидами.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антигенсвязывающая молекула, которая несет по меньшей мере один гипервариабельный участок мышиного антитела B-Ly1 или его вариант или укороченную форму, которые содержат, по меньшей мере, определяющие специфичность остатки указанного гипервариабельного участка и которые содержат последовательность, выведенную из гетерологичного полипептида. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула несет три гипервариабельных участка мышиного антитела B-Ly1 или их варианты или укороченные формы, содержащие, по меньшей мере, определяющие специфичность остатки каждого из трех указанных гипервариабельных участков. Согласно другому варианту осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула содержит вариабельную область легкой или тяжелой цепи антитела. Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой химерное (например, гуманизированное) антитело. Изобретение относится также к способам получения таких антигенсвязывающих молекул и к их применению для лечения заболевания, включая B-клеточные лимфомы.

Известно несколько механизмов, которые обусловливают терапевтическую эффективность антител к CD20, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и индукцию замедления роста или апоптоза. Например, большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что действие ритуксимаба обусловлено обычными эффекторными механизмами, которые оценивают путем анализов CDC и ADCC. Аналогично этому было установлено, что устойчивость различных клеток лимфомы к ритуксимабу *in vivo* является функцией их чувствительности к CDC *in vitro*. В противоположность этому для механизма действия *in vivo* другого антитела, рекомендованного для применения в терапии, такого как B1, не требуется ни комплементзависимой, ни связанной с естественными клетками-киллерами (NK) активности. В большей степени эффективность B1 *in vivo* является результатом его способности индуцировать выраженный апоптоз.

В целом, моноклональные антитела к CD20 подразделяются на две различные категории на основе их механизма действия, обеспечивающего уничтожения клеток лимфомы. Антитела типа I к CD20 прежде всего используют комплемент для уничтожения клеток-мишеней, в то время как антитела типа II проявляют действие посредством других механизмов, прежде всего апоптоза. Ритуксимаб и 1F5 являются примерами антител типа I к CD20, а B1 является примером антитела типа II (см., например, Cragg M.S. и Glennie M.J., Blood 103(7), апрель 2004, с. 2738-2743; Teeling J.L. и др., Blood 104(6), сентябрь 2004, с. 1793-1800), содержание публикаций полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Настоящее изобретение является первым известным примером создания антитела типа II к CD20, которое обладает повышенными эффекторными функциями, такими как ADCC, сохраняя при этом способность индуцировать эффективный апоптоз. Таким образом, настоящее изобретение относится к сконструированному антителу типа II к CD20, которое обладает повышенной ADCC, что является результатом указанного конструирования, и не утрачивает выраженную способность индуцировать апоптоз. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения сконструировали антитела типа II к CD20, которые имели измененную схему гликозилирования в Fc-области. Согласно конкретному варианту осуществления изобретения измененное гликозилирование предусматривает повышенный уровень бисекционных комплексных остатков в Fc-области. Согласно другому конкретному варианту осуществления изобретения измененное гликозилирование предусматривает также и понижение уровня остатков фукозы в

Fc-области (см. опубликованную заявку на патент США № 20040093621 на имя фирмы Shitara и др., содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. В другом варианте осуществления изобретения антитела типа II к CD20 создают с помощью метода конструирования полипептидов, который изложен в U.S. 6737056 на имя Presta или в опубликованной заявке на патент США № 20040185045 (на имя Macrogenics) или в опубликованной заявке на патент США № 20040132101 (на имя Xencor), содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Изобретение относится также к способам получения таких сконструированных антител типа II и к способам применения таких антител для лечения различных В-клеточных нарушений, включая В-клеточные лимфомы.

Химерные мышиные/человеческие антитела являются известными (см., например, Morrison S.L. и др., PNAS II, ноябрь 1984 г., с. 6851-6854; опубликованный европейский патент № 173494; Boulianna G.L. и др., Nature 312, декабрь 1984 г., с. 642; Neubeiger M.S. и др., Nature 314, март 1985 г., с. 268; опубликованный европейский патент № 125023; Tan и др., J. Immunol. 135, ноябрь 1985 г., с. 8564; Sun L.K. и др., Hybridoma 5(1), 1986, с. 517; Sahagan и др., J. Immunol. 137, 1986, с. 1066-1074). Общие сведения приведены у Muron, Nature 312, декабрь 1984 г., с. 597; Dickson, Genetic Engineering News 5(3), март 1985 г.; Marx, Science 229, август 1985 г., с. 455 и Morrison, Science 229, сентябрь 1985 г., с. 1202-1207. Robinson с соавт. в опубликованной заявке PCT WO/88104936 описали химерное антитело, которое несет человеческую константную область и мышью вариабельную область, обладающую специфичностью в отношении эпитопа CD20; мышьный фрагмент химерного антитела по данным Robinson выведен из мышьного моноклонального антитела 2H7 (гамма 2b, каппа). Несмотря на то что в указанной ссылке это химерное антитело рассматривается в качестве "основного кандидата" для лечения В-клеточных нарушений, специалисты в данной области могут рассматривать его только как гипотетичное при определении того, справедливо ли оно для конкретного антитела, прежде всего из-за того, что в ссылке отсутствуют какие-либо данные, подтверждающие утверждение о наличии терапевтической эффективности, и, что является важным, результаты, полученные с использованием высших млекопитающих, таких как приматы или люди.

Методологии получения химерных антител известны в данной области. Например, легкую и тяжелую цепи можно экспрессировать по отдельности, используя, например, легкую цепь иммуноглобулина и тяжелую цепь иммуноглобулина в различных плазмидных векторах или в одном (например, полицистронном) векторе. Затем их можно очищать и собирать *in vitro* с получением полных антител; методы осуществления такой сборки известны (см., например, Scharff M., Harvey Lectures 69, 1974, с. 125). Параметры реакций *in vitro* для получения антител в виде IgG из восстановленных выделенных легких и тяжелых цепей также описаны в литературе (см., например, Sears и др., Biochem. 16(9), 1977, с. 2016-2025).

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения химерная ACM, предлагаемая в настоящем изобретении, представляет собой гуманизированное антитело. Методы гуманизации антител, полученных из организма, кроме человека, известны в данной области. Например, гуманизированные ACM, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать с помощью методов, описанных в U.S. 5225539 на имя Winter, U.S. 6180370 на имя Queen и др. или U.S. 6632927 на имя Adair и др., полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Предпочтительно гуманизированное антитело несет один или несколько интродуцированных аминокислотных остатков из источника, кроме человека. Эти аминокислотные остатки из источника, кроме человека, часто называют "импортными" остатками, которые, как правило, получают из "импортной" вариабельной области. Гуманизацию, как правило, осуществляют с помощью метода, описанного у Winter с сотрудниками (Jones и др., Nature, 321, 1986, с. 522-525; Riechmann и др., Nature, 332, 1988, с. 323-327; Verhoeven и др., Science, 239, 1988, с. 1534-1536), путем замены последовательностей гипервариабельных участков на соответствующие последовательности человеческого антитела. Таким образом, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (U.S. 4816567), в которых область, существенно меньшая по сравнению с интактной человеческой вариабельной областью, заменена на соответствующую последовательность из видов, кроме человека. На практике гуманизированные антитела представляют собой типичные человеческие антитела, в которых некоторые остатки гипервариабельного участка и, вероятно, некоторые остатки FR-участка заменены остатками из аналогичных сайтов антител грызунов. Предлагаемые в изобретении гуманизированные антитела к CD20 должны содержать константные области человеческого иммуноглобулина.

Выбор человеческих вариабельных областей как легкой, так и тяжелой цепей, применяемых для создания гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности. Согласно так называемому методу "наилучшего подбора" последовательность вариабельной области антитела грызунов подвергают скринингу с использованием полной библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных областей. Затем человеческую последовательность, наиболее сходную с последовательностью грызунов, отбирают в качестве человеческого каркасного участка (FR) для создания гуманизированного антитела (Sims и др., J. Immunol., 151, 1993, с. 2296; Chothia и др., J. Mol. Biol., 196, 1987, с. 901). Другой метод выбора последовательности человеческого каркасного участка заключается в сравнении последовательности каждой индивидуальной подобласти полного каркасного участка грызунов (т.е. FR1, FR2,

FR3 и FR4) или определенной комбинации индивидуальных подобластей (например, FR1 и FR2) и библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных областей, которые соответствуют указанной каркасной подобласти (например, с использованием нумерации по Кэботу), и выборе человеческой последовательности для каждой подобласти или комбинации, которая является наиболее сходной с последовательностью грызунов (Leung, заявка на патент США № 2003/0040606A1, опубликованная 27 февраля 2003 г.). Еще один метод основан на применении конкретного каркасного участка, выведенного из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких и тяжелых цепей. Один и тот же каркасный участок можно применять для нескольких различных гуманизированных антител (Carter и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1992, с. 4285; Presta и др., J. Immunol., 151, 1993, с. 2623).

Также важно, чтобы антитела, будучи гуманизированными, сохраняли их высокую аффинность к антигену и другие ценные биологические свойства. Для решения этой задачи согласно предпочтительному способу гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа родительских последовательностей и различных концептуальных (схематических) гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов доступны и хорошо известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных в качестве перспективных ("кандидатов") последовательностей иммуноглобулинов. Оценка этих изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в проявлении функции последовательности иммуноглобулина- "кандидата", т.е. анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина- "кандидата" связываться с антигеном. Таким методом можно отбирать остатки FR-участка и объединять остатки, полученные из реципиента и "импортные" последовательности так, чтобы получать требуемые характеристики антитела, такие как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени(ям). В целом, остатки гипервариабельных участков непосредственно и в наибольшей степени оказывают воздействие на связывание антигена.

Согласно другому варианту осуществления изобретения антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, конструируют так, чтобы они обладали повышенной аффинностью к связыванию, например, с использованием методов, описанных в опубликованной заявке на патент США № 2004/0132066 на имя Balint и др., полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, конъюгируют с дополнительным фрагментом, таким как радиоактивная метка или токсин. Такие конъюгированные АСМ можно получать многочисленными методами, хорошо известными в данной области.

Различные радионуклиды можно применять согласно настоящему изобретению, и специалисты в данной области могут легко определить, какой радионуклид является наиболее пригодным в различных ситуациях. Например, йод представляет собой хорошо известный радионуклид, применяемый для целенаправленной иммунотерапии. Однако клиническая применимость <sup>131</sup>йода может быть ограничена некоторыми факторами, которые включают: восьмидневный физический период полураспада; дегалогенизация йодированного антитела как в крови, так и в областях опухоли; и характеристики испускания (например, высокий уровень гамма-компонент), что может оказаться не оптимальным для локализованного отложения дозы в опухоли. С появлением более эффективных хелатирующих агентов возможность присоединения к белкам хелатирующих групп металлов повысила возможность использования других радионуклидов, таких как <sup>111</sup>индий и <sup>90</sup>иттрий. <sup>90</sup>Иттрий обладает рядом преимуществ при радиоиммунотерапевтическом применении: 64-часовой период полураспада <sup>90</sup>иттрия является достаточным для накопления антитела опухолью и, например, в отличие от <sup>131</sup>йода <sup>90</sup>иттрий испускает только бета-лучи высокой энергии без накопления гамма-излучения при его распаде на участке ткани диаметром 100-1000 клеток. Кроме того, минимальное количество проникающей радиации позволяет вводить антитела, меченные иттрием, амбулаторным больным. Кроме того, для уничтожения клетки не требуется интернализация меченого антитела, и местное испускание ионизирующего излучения должно быть летальным для прилегающих опухолевых клеток, лишенных антигена-мишени.

Эффективные однократные дозы (т.е. терапевтически эффективные количества) меченых с помощью <sup>90</sup>иттрия антител к CD20 составляют от примерно 5 и до примерно 75 мКи, более предпочтительно от примерно 10 до примерно 40 мКи. Эффективные однократные неаблятивные дозы (при использовании которых не требуется трансплантация костного мозга), меченых с помощью <sup>131</sup>йода антител к CD20 составляют от примерно 5 и до примерно 70 мКи, более предпочтительно от примерно 5 и до примерно 40 мКи. Эффективные однократные аблтивные дозы (т.е. при применении которых может потребоваться аутологичная трансплантация костного мозга) меченых с помощью йода антител к CD20 составляют от примерно 30 и до примерно 600 мКи, более предпочтительно от примерно 50 и менее чем примерно 500 мКи. С учетом того, что химерное антитело к CD20 обладает более продолжительным периодом полужизни в кровотоке по сравнению с мышевыми антителами, эффективные однократные неаблятивные дозы (при использовании которых не требуется трансплантация костного мозга) меченых с помощью

<sup>131</sup>Йода химерных антител к CD20 составляют от примерно 5 и до примерно 40 мКи, более предпочтительно менее чем примерно 30 мКи. Критерии визуализации, например, в случае использования в качестве метки <sup>111</sup>индия, как правило, составляют менее примерно 5 мКи.

При лечении с использованием радиоактивно меченых антител к CD20 можно использовать как однократную терапевтическую обработку, так и несколько обработок. Из-за присутствия радионуклидного компонента предпочтительно, чтобы перед лечением периферические стволовые клетки ("PSC") или клетки костного мозга ("BM") были "собраны" с целью оценки их способности к выживанию в присутствии потенциально смертельной для костного мозга токсичности радиации. BM и/или PSC выделяют стандартными методами и затем очищают и замораживают для возможной реинфузии. Кроме того, наиболее предпочтительно перед лечением проводить диагностическое дозиметрическое исследование пациента с помощью диагностического меченого антитела (например, с помощью индия), целью которого является гарантия того, что терапевтическое меченое антитело (например, с помощью иттрия) не концентрируется в излишнем количестве в любом здоровом органе или ткани.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая представлена ниже в табл. 3. Изобретение относится также к выделенной нукleinовой кислоте, содержащей последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая представлена ниже в табл. 2. Следующим вариантом осуществления изобретения является выделенная нукleinовая кислота, содержащая последовательность, которая кодирует полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в табл. 3. Под объем изобретения подпадает также выделенная нукleinовая кислота, содержащая последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность любой из представленный в табл. 3 конструкций с консервативными аминокислотными заменами.

Таблица 2

Конструкция	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGG ATGAGCTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGCGA TGGGGATACTGACTACGCACAGAAATTCCAAGG AAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACCGGCCGTGATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGTGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCA	29
B-HH2	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGG ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGCGA TGGGGATACTGACTACACAATGGGAAATTCAAGG CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACCGGCCGTGATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGTGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCA	31
B-HH3	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGG ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGCGA TGGGGATACTGACTACACAATGGGAAATTCAAGG CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACCGGCCGTGATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGTGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCA	33
B-HH4	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGG ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGCGA TGGGGATACTGACTACACAATGGGAAATTCAAGG CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACCGGCCGTGATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGTGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCA	35

B-HH5	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACCGCTTCAGCTATTCTTGG ATGAGCTGGGTGCGGCAGGCGCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCAGCGA TGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGG CAGAGTCACAATTACGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGCC CAGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	37
B-HH6	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACGCCCTTCAGCTATTCTTGG ATCAATTGGGTGCGGCAGGCGCTGGACAAGGG CTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCAGCGA GGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACGCCGACAAATCCACTAGC ACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAAT GTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGCC AGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	39
B-HH7	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACGCCCTTCAGCTATTCTTGG ATCTCGTGGGTGCGGCAGGCGCTGGACAAGGG CTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCAGCGA GGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACGCCGACAAATCCACTAGC ACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAAT GTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGCC AGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	41
B-HH8	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGCGCTCACTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCACATACAGCTGG ATGAACCTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCAGCGA TGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGG CAGAGTCACAATTACGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGCC CAGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	43

B-HH9	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGCGCTCAGTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGG ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCC GGCGA TGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGG CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	45
B-HL1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG ATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGG CTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCC GGCGA GGGGATACTGACTACGCACAGAAATTCCAAGGA AGAGTCACAATGACACGGGACACGTCCACTTC ACCGTCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGC AGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	47
B-HL2	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGGGCACCCTGCAAGATCTCCTGC AAGGTGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG ATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCC GGCGA TGGGGATACTGACTACCCAGAGAAATTCCAAGG AAGAGTCACAATCACAGCCGACACGTCCACTGA CACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	49
B-HL3	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGCCTGGGGCACCCTGCAAGATCTCCTGC AAGGTGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCC GGCGA TGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGG AAGAGTCACAATCACAGCCGACACGTCCACTGA CACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTGTACTGGGC CAGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCA	51

B-HL4	CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT AAGAAGACCGGGAGTTCACTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCCGGATACACCTTCACCTTATTCTTG ATGAGCTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCAGCGA TGGGGATACTGACTACGCACAGAAATTCCAAGG AAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA TGTCTTGATGGTTACTGGCTTACTGGGC CAGGGAAACCTGGTACCGTCTCCTCAGCTAGC ACC	53
B-HL8	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGGAGGCTTG GTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGA TGAACCTGGGTGCGGCAGGCTCTGGAAAGGGCC TCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCAGCGATG GGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCA GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCA CAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATG TCTTGATGGTTACTGGCTTACTGGGC GGGAACCTGGTACCGTCTCCTCA	55
B-HL10	CGGAATTGGCCCCACCGGTGGGCCACATGGACT GGACCTGGAGGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG CCACAGGAGCCCACCTCCGAAGTGCAGCTGGTGG AGTCTGGAGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGT CCCTGCGGCCTCCTGGCTGGATTGGC ATTCAGCTATTCTGGATGAACTGGGTGCGGC GGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG GATCTTCCGGCGATGGGATACTGACTACAA GGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGCTTGATGGTTACTGG CTTGTGTTACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACC GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	57
B-HL11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGGAGGCTTG GTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGA TGAACCTGGGTGCGGCAGGCTCTGGAAAGGGCC TCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCAGCGATG GGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCA GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCA CAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATG TCTTGATGGTTACTGGCTTACTGGGC GGGAACCTGGTACCGTCTCCTCA	59

B-HL12	CGGAATTCCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACT GGACCTGGAGGATCCTCTTGGTGGCAGCAG CCACAGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGG AGTCTGGAGCAGGCTTGGTCAAGGCTGGCGGGT CCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGGATTACAC ATTTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCA GGCTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG GATCTTCCCGCGATGGGATACTGACTACAA TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGGTTACTGG CTTGTAACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACC GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	61
B-HL13	CGGAATTCCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACT GGACCTGGAGGATCCTCTTGGTGGCAGCAG CCACAGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGG AGTCTGGAGGAGGCGTGGTCAAGGCTGGCGGGT CCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGGATTACAC ATTTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCA GGCTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG GATCTTCCCGCGATGGGATACTGACTACAA TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGGTTACTGG CTTGTAACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACC GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	63
B-HL14	CGGAATTCCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACT GGACCTGGAGGATCCTCTTGGTGGCAGCAG CCACAGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGG AGTCCGGAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGG TCCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGGATTCA CATTTAGCTATTCTTGGATGAACCTGGGTGCGG AGGCTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGAC GGATCTTCCCGCGATGGGATACTGACTACA ATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCG CCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGC TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGGTTACTG GCTTGTAACTGGGCCAGGGAACCTGGTCAC CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	65

B-HL15	<u>CGGAATTGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCC ACTCCGAAGTGCAAGCTGGCTCT</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTGGTCAAGCTGGCTCT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCCTGCGCAGCCTGGATTCAAC</u> <u>ATTTAGCTATTCTTGATGAACCTGGGTGCGGCAC</u> <u>GGCTCCTGAAAGGGCTCGAGTGGTGGGACG</u> <u>GATCTTCCCGGCATGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTAACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	67
B-HL16	<u>CGGAATTGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCC ACTCCGAAGTGCAAGCTGGCTCT</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTGGTCAAGCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGCTCAGCTGCGCAGCCTGGATTCA</u> <u>CATTTAGCTATTCTTGATGAACCTGGGTGCGGC</u> <u>AGGCTCCTGAAAGGGCTCGAGTGGTGGGAC</u> <u>GGATCTTCCCGGCATGGGATACTGACTACAA</u> <u>ATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCG</u> <u>CCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGC</u> <u>TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTAACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	69
B-HL17	<u>CGGAATTGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCC ACTCCGAAGTGCAAGCTGGCTCT</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTGGTCAAGCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCCTGCGCAGCCTGGATTCAAC</u> <u>ATTTAGCTATTCTTGATGAACCTGGGTGCGGCAC</u> <u>GGCTCCTGAAAGGGCTCGAGTGGTGGGACG</u> <u>GATCTTCCCGGCATGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTAACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	71
Сигнальная последовательность VH	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCCCACCTCC</u>	73
B-KV1	<u>GATATCGTGTGACCCAGACTCCACTCTCCCTG</u> <u>CCCGTCACCCCTGGAGAGAGCCGCCAGCATAGC</u> <u>TGCAGGTCTAGCAAGAGCCTTGCACAGCAAT</u> <u>GGCATCACTTATTGTATTGGTACCTGCAAAG</u> <u>CCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATTTCACAA</u> <u>ATGTCCAACCTTGTCTTGGCGTCCCTGACCGGT</u> <u>TCTCCGGATCCGGGTCAAGGCACTGATTTCACAC</u> <u>TGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG</u> <u>GAGTTTATTACTGCGCTCAGAAATCTAGAACTTC</u> <u>CTTACACCTCGGCCGGAGGGACCAAGGTGGAGA</u> <u>TCAAACCGTACGGTG</u>	75
Сигнальная последовательность VL	<u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGC</u> <u>CTCCTGCTGCTGGTCCCCAGGTGCCAGGTGT</u>	77

Таблица 3

Конструкция	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
B-HH1	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMS</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYAQKFQGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLV</u> <u>YWGQGTLTVSS</u>	<u>30</u>
B-HH2	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLV</u> <u>YWGQGTLTVSS</u>	<u>32</u>
B-HH3	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYLICARNVFDGYWLV</u> <u>YWGQGTLTVSS</u>	<u>34</u>
B-HH4	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYAFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGTLTVSS</u>	<u>36</u>
B-HH5	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMS</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGTLTVSS</u>	<u>38</u>
B-HH6	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINW</u> <u>VROAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVY</u> <u>WGQGTLTVSS</u>	<u>40</u>
B-HH7	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWISW</u> <u>VROAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVY</u> <u>WGQGTLTVSS</u>	<u>42</u>
B-HH8	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGTLTVSS</u>	<u>44</u>

B-HH9	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMN</u> WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>46</u>
B-HL1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMH</u> WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYAOKEQGRVT MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARNVFDGY WLVYWGQGTLVTVSS	<u>48</u>
B-HL2	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFYSWMH</u> WVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYAEKFOGRVTI TADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>50</u>
B-HL3	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFYSWMN</u> WVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTI TADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>52</u>
B-HL4	<u>QMQLVQSGAEVKKTGSVVKVSCKASGYTFTYSWMS</u> WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYAOKEQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	<u>54</u>
B-HL8	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>56</u>
B-HL10	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNW</u> VRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	<u>58</u>
B-HL11	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>60</u>
B-HL12	<u>EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>62</u>
B-HL13	<u>EVQLVESGGVVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	<u>64</u>
B-HL14	<u>EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	<u>66</u>
B-HL15	<u>EVQLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	<u>68</u>
B-HL16	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMN</u> VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	<u>70</u>
B-HL17	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	<u>72</u>
Сигнальная последовательность VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	<u>74</u>
B-KV1	<u>DIVMTQPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLY</u> WYLOKPGQSPOLLIVQMSNLVSGVPDRFSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKR TV	<u>76</u>
Сигнальная последовательность VL	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARC</u>	<u>78</u>

Другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 1 или 2. Изобретение относится также к выделенной нукleinовой кислоте, содержащей последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 5 или 6. Следующим вариантом осуществления изобретения является выделенная нукleinовая кислота, которая содержит последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 5 или 6. Под объем изобретения подпадает также выделенная нукleinовая кислота, которая содержит последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого представлена на одной из фиг. 1, 2, 5 или 6 с консервативными аминокислотными заме-

нами.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является экспрессионный вектор и/или клетка-хозяин, которые содержат один или несколько выделенных полинуклеотидов, предлагаемых в настоящем изобретении.

Как правило, любую культивируемую клеточную линию можно применять для экспрессии ACM, предлагаемой в настоящем изобретении. В предпочтительном варианте осуществления изобретения СНО-клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышиной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PE11.C6-клетки или клетки гибридомы, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или растительные клетки используют в качестве основной клеточной линии для создания клеток-хозяев, предлагаемых в изобретении.

Терапевтическую эффективность ACM, предлагаемых в настоящем изобретении, можно усиливать, получая их в клетке-хозяине, которая дополнительно экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид, который обладает GnTIII-активностью. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который содержит домен локализации в комплексе Гольджи присущего комплексу Гольджи полипептида. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения экспрессия ACM, предлагаемых в настоящем изобретении, в клетке-хозяине, которая экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид, который обладает GnTIII-активностью, приводит к получению ACM, которые обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией. Таким образом, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является клетка-хозяин, содержащая (а) выделенную нуклеиновую кислоту, которая содержит последовательность, кодирующую полипептид, который обладает GnTIII-активностью; и (б) выделенный полинуклеотид, который кодирует ACM, предлагаемую в настоящем изобретении, такую как химерное, приматизированное или гуманизированное антитело, которое связывается с человеческим CD20. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII, а домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II. Методы получения таких слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны в предварительной заявке на патент США № 60/495142, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения химерная ACM представляет собой химерное антитело или его фрагмент, которые обладают способностью к специальному связыванию, свойственную мышенному антителу B-LY1. Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения химерное антитело содержит человеческую Fc-область. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления антитело является приматизированным или гуманизированным.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих ACM, предлагаемые в настоящем изобретении, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или в другом варианте регулируемой экспрессионной системы. Приемлемые регулируемые экспрессионные системы включают (но не ограничиваясь ими) регулируемую тетрацикличином экспрессионную систему, индуцируемую экдизоном экспрессионную систему, переключаемую с помощью lac экспрессионную систему, индуцируемую глюкокортикоидом экспрессионную систему, систему с использованием индуцируемого температурой промотора и индуцируемую металлом металло-тионеина экспрессионную систему. Если в систему клетки-хозяина входят несколько различных нуклеиновых кислот, кодирующих ACM, предлагаемые в настоящем изобретении, то некоторые из них можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора, а другие экспрессировать под контролем регулируемого промотора. За максимальный уровень экспрессии принимают наиболее высокий возможный уровень стабильной экспрессии полипептида, который не оказывает значительного вредного воздействия на скорость клеточного роста, и его можно определять с помощью обычного эксперимента. Уровни экспрессии определяют методами, хорошо известными в данной области, в том числе с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антитела, специфического в отношении ACM, или антитела, специфического к пептидной метке, слитой с ACM; и методом Нозерн-блоттинга. В другом варианте полинуклеотид может быть функционально связан с репортерным геном; уровни экспрессии химерной ACM, которая имеет аффинность связывания, практически такую же, как у мышнного антитела B-Ly1, определяют, оценивая сигнал, который коррелирует с уровнем экспрессии репортерного гена. Репортерный ген можно транскрибировать вместе с нуклеиновой(ами) кислотой(ами), которая(ые) кодирует(ют) слитый полипептид, в виде одной молекулы мРНК; соответствующие им кодирующие последовательности могут быть слиты либо с помощью внутреннего сайта входа в рибосому (IRES) или с помощью независящего от кэпа энхансера трансляции (CITE). Репортерный ген можно транслировать в сочетании по меньшей мере с одной нуклеиновой кислотой, кодирующей химерную ACM, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышнного антитела B-Ly1, с образованием одной полипептидной цепи. Нуклеиновые кислоты, которые кодируют ACM, предлагаемые в настоящем изобретении, можно функционально связывать с репортерным геном под контролем одного промотора так, чтобы нуклеино-

вая кислота, кодирующая слитый полипептид и репортерный ген, транскрибировалась с молекулы РНК, из которой в результате альтернативного сплайсинга образовывались две различные молекулы матричной РНК (мРНК); после трансляции одной из образовавшихся мРНК получают репортерный белок, а после трансляции второй получают указанный слитый полипептид.

Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность АСМ, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, наряду с соответствующими транскрипционными/трансляционными контролирующими сигналами, применяют методы, хорошо известные специалистам в данной области. Эти методы представляют собой методики *in vitro* рекомбинантной ДНК, методы синтеза и методы рекомбинации/генетической рекомбинации *in vivo* (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Molecular Cloning A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) и Ausubel и др., Current Protocols in Molecular Biology, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).

Для экспрессии кодирующей последовательности АСМ, предлагаемой в настоящем изобретении, можно использовать различные системы экспрессионных векторов-хозяев. Предпочтительно клетки млекопитающих применяют в качестве систем клеток-хозяев, трансфектированных экспрессионными векторами в виде рекомбинантной плазмидной ДНК или рекомбинантной космидной ДНК, которые содержат кодирующую последовательность представляющего интерес белка и кодирующую последовательность слитого полипептида. Наиболее предпочтительно в качестве системы клетки-хозяина применяют СНО-клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышной миеломы линии Р3Х63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых и растительные клетки. Некоторые примеры экспрессионных систем и методов отбора даны в следующих публикациях и приведенных в них ссылках: Borth и др., Biotechnol. Bioen. 71(4), 2000-2001, с. 266-273, Werner и др., Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8), 1998, с. 870-880, Andersen и Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13, 2002, с. 117-123, Chadd и Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12, 2001, с. 188-194 и Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12, 2001, с. 450-454. В альтернативных вариантах осуществления изобретения можно применять другие системы на основе эукариотических клеток-хозяев, такие как клетки дрожжей, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, которые содержат последовательность, кодирующую АСМ, предлагаемую в настоящем изобретении; системы клеток насекомых, зараженных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусными), содержащими кодирующую последовательность химерной АСМ, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1; системы растительных клеток, зараженные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV), или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмидными), которые содержат кодирующую последовательность АСМ, предлагаемой в изобретении; или системы на основе клеток животных, зараженных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, адено-вирусными, на основе вируса оспы), включая клеточные линии, сконструированные так, что они содержат множество копий ДНК, кодирующей химерную АСМ, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, где копии либо стабильно амплифицируются (CHO/dhfr), либо нестабильно амплифицируются в двойных микрохромосомах (например, мышные клеточные линии). Согласно одному из вариантов осуществления изобретения вектор, содержащий полинуклеотид(ы), который(ые) кодирует(ют) АСМ, предлагаемую в изобретении, является полицистронным. Кроме того, согласно одному из вариантов осуществления изобретения указанная выше АСМ представляет собой антитело или его фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления изобретения АСМ представляет собой гуманизированное антитело.

В способах, предлагаемых в настоящем изобретении, понятие "стабильная экспрессия", как правило, предпочтительно относится к кратковременной экспрессии, поскольку при этом обычно получают более воспроизводимые результаты, а также это больше соответствует крупномасштабному производству. Помимо применения экспрессионных векторов, которые содержат вирусные сайты инициации репликации, клетки-хозяева можно трансформировать соответствующими кодирующими нуклеиновыми кислотами, которые находятся под контролем соответствующих контролирующих экспрессию элементов (например, промоторные, энхансерные последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т.д.), и селектируемым маркером. После интродукции чужеродной ДНК созданным клеткам можно давать растить в течение 1-2 дней в обогащенных средах, а затем переносить на селективные среды. Селектируемый маркер в рекомбинантных плазмidaх придает устойчивость к селектирующему агенту и позволяет отбирать клетки, в хромосомах которых присутствует стабильно интегрированная плазмида, и выращивать до образования очагов, которые в свою очередь можно клонировать и размножать с получением клеточных линий.

Можно применять многочисленные системы селекции, включая (но не ограничиваясь ими) гены тимидинкиназы герпеса простого (Wigler и др., Cell 11, 1977, с. 223), гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (Szybalska и Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 1962, с. 2026), и аденин-фосфорибозилтрансферазы (Lowy и др., Cell 22 1980, с. 817), которые можно применять в t<sup>r</sup>-, hgprt<sup>r</sup>- или

арг<sup>t</sup>-клетках соответственно. Кроме того, можно использовать устойчивость к антиметаболитам в качестве основы для отбора гена dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler и др., Natl. Acad. Sci. USA 77, 1989, с. 3567; O'Hare и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1981, с 1527); гена gpt, который придает устойчивость к миокофенольной кислоте (Mulligan и Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1981, с. 2072); гена neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin и др., J. Mol. Biol. 150, 1981, с. 1; и гена hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre и др., Gene 30, 1984, с. 147). В настоящее время описаны дополнительные селектируемые гены, такие как trpB, который обуславливает возможность клеток утилизировать индол вместо триптофана; hisD, который обуславливает возможность клеток утилизировать гистидол вместо гистидина (Hartman и Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, с. 8047); система глутаминсинтазы и ODC (орнитиндекарбоксилаза), который придает устойчивость к ингибитору орнитиндекарбоксилазы, 2-(дифторметил)-DL-орнитину, DFMO (McConlogue, в: Current Communications in Molecular Biology, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory (1987)).

В настоящем изобретении описан также способ модификации профиля гликозилирования ACM, предлагаемых в настоящем изобретении, которые продуцируются клеткой-хозяином, заключающийся в том, что экспрессируют в клетке-хозяине нуклеиновую кислоту, кодирующую ACM, предлагаемую в изобретении, и нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который обладает GnTIII-активностью, или вектор, содержащий указанные such нуклеиновые кислоты. Предпочтительно модифицированный полипептид представляет собой IgG или его фрагмент, содержащий Fc-область. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения ACM представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент.

Модифицированные ACM, продуцируемые клетками-хозяевами, предлагаемыми в изобретении, в результате модификации обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и/или повышенной эффекторной функцией. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения ACM представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент, содержащий Fc-область. Предпочтительно повышенная аффинность к связыванию с Fc-рецептором представляет собой повышенное связывание с активирующим Fc<sub>γ</sub>-рецептором, таким как Fc<sub>γ</sub>RIIIa-рецептор. Повышенная эффекторная функция предпочтительно представляет собой повышение одной или нескольких следующих функций: повышенная антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, повышенный антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), повышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с полиморфноядерными клетками (PMN), повышенное связывание с моноцитами, повышенное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное созревание дендритных клеток и повышенное Т-клеточное примирение.

В настоящем изобретении предложен также способ получения ACM, предлагаемой в настоящем изобретении, которая имеет модифицированные олигосахариды в клетке-хозяине, заключающийся в том, что (а) культивируют клетку-хозяина, сконструированную для экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который обладает GnTIII-активностью, в условиях, которые позволяют осуществлять производство ACM, предлагаемой в настоящем изобретении, где полипептид, обладающий GnTIII-активностью, экспрессируют в количестве, достаточном для модификации олигосахаридов в Fc-области ACM, продуцируемой клеткой-хозяином; и (б) выделяют указанную ACM. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который несет каталитический домен GnTIII. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения слитый полипептид содержит дополнительно домен локализации в комплексе Гольджи присущего комплексу Гольджи полипептида.

Предпочтительно домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II или GnTII. В альтернативном варианте домен локализации в комплексе Гольджи выбирают из группы, включающей: домен локализации маннозидазы I, домен локализации GnTII и домен локализации  $\alpha$ -1-6 коровой фукозилтрансферазы. ACM, полученные с помощью способов, предлагаемых в настоящем изобретении, обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и/или повышенной эффекторной функцией. Предпочтительно повышенная эффекторная функция представляет собой одну или несколько следующих функций: повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (включая повышенную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность), повышенный антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), повышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с моноцитами, повышенное связывание с полиморфноядерными клетками, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное перекрестное связывание связывающихся с мишенью антител, повышенное созревание дендритных клеток

или повышенное Т-клеточное примирение. Повышенная аффинность к связыванию с Fc-рецептором предпочтительно представляет собой повышенное связывание с активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами, таким как Fc $\gamma$ RIIIa-рецептор. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения ACM представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент.

Еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения является химерная ACM, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, полученная способами, предлагаемыми в изобретении, с повышенным содержанием бисекционных олигосахаридов в Fc-области указанного полипептида. Подразумевается, что к таким ACM относятся антитела и их фрагменты, содержащие Fc-область. В предпочтительном варианте осуществления изобретения ACM представляет собой гуманизированное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения процент бисекционных олигосахаридов в Fc-области ACM составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90-95% от общего содержания олигосахаридов. Согласно следующему варианту осуществления изобретения ACM, полученная способами, предлагаемыми в изобретении, имеет повышенное содержание нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области в результате модификации олигосахаридов с помощью способов, предлагаемых в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения процент нефукозилированных олигосахаридов составляет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60-70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 75%. Нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения ACM, полученная в клетках-хозяевах и с помощью способов, предлагаемых в изобретении, обладает повышенным содержанием бисекционных нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области. Бисекционные нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридными или комплексными. В частности, способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно использовать для получения ACM, в которых по меньшей мере 15%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 35% олигосахаридов Fc-области ACM являются бисекционными нефукозилированными. Способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять также для получения полипептидов, в которых по меньшей мере 15%, предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 35% олигосахаридов в Fc-области полипептида являются бисекционными гибридными нефукозилированными.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является химерная ACM, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, сконструированная таким образом, что она обладает повышенной эффекторной функцией и/или повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором, которую получают способами, предлагаемыми в изобретении. Предпочтительно повышенная эффекторная функция представляет собой одну или несколько следующих функций: повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (включая повышенную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность), повышенный антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), повышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с моноцитами, повышенное связывание с полиморфноядерными клетками, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное перекрестное связывание связывающихся с мишенью антител, повышенное созревание дендритных клеток или повышенное Т-клеточное примирение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения повышенная аффинность к связыванию с Fc-рецептором означает повышенное связывание с активирующим Fc-рецептором, наиболее предпочтительно Fc $\gamma$ RIIIa. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения ACM представляет собой антитело, фрагмент антитела, содержащий Fc-область, или слитый белок, который включает область, эквивалентную Fc-области иммуноглобулина. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения ACM представляет собой гуманизированное антитело.

Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим ACM, предлагаемым в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к применению таких фармацевтических композиций в способе лечения рака. В частности, в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, заключающийся в том, что вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении.

Настоящее изобретение относится также к получению и применению систем клеток-хозяев для получения гликоформ ACM, предлагаемых в настоящем изобретении, которые обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором, предпочтительно повышенной аффинностью к связыванию с активирующими Fc-рецепторами, и/или повышенными эффекторными функциями, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность. Методы конструирования схем гликозилирования,

которые можно использовать для АСМ, предлагаемых в настоящем изобретении, более подробно описаны в U.S. 6602684 и предварительной заявке на патент США 60/441307 и в WO 2004/065540, полное содержание каждого из этих документов включено в настоящее описание в качестве ссылки. В другом варианте в АСМ, предлагаемых в настоящем изобретении, можно конструировать схемы гликозилирования, отличающиеся пониженным содержанием фукозных остатков в Fc-области, с помощью методов, описанных в EP 1176195A1, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Получение клеточных линий для производства белков с измененной схемой гликозилирования.

В настоящем изобретении предложены системы экспрессии клеток-хозяев для получения АСМ, предлагаемых в настоящем изобретении, которые имеют модифицированные схемы гликозилирования. В частности, в настоящем изобретении предложены системы клеток-хозяев для получения гликоформ АСМ, предлагаемых в настоящем изобретении, которые имеют повышенную терапевтическую ценность. Таким образом, в изобретении предложены системы экспрессии клеток-хозяев, выбранных или сконструированных для экспрессии полипептида, который обладает GnTIII-активностью. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который содержит домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида. В частности, системы экспрессии клеток-хозяев можно создавать так, чтобы они содержали рекомбинантную молекулу нукleinовой кислоты, которая кодирует полипептид, обладающий GnTIII-активностью, функционально связанную с конститутивной или регулируемой промоторной системой.

Одним из конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения является клетка-хозяин, которую сконструировали для экспрессии по меньшей мере одной нукleinовой кислоты, кодирующую слитый полипептид, который обладает GnTIII-активностью, и который содержит домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида. Следующим объектом изобретения является созданная клетка-хозяин, которая несет молекулу нукleinовой кислоты, содержащую по меньшей мере один ген, который кодирует слитый полипептид, обладающий GnTIII-активностью, и содержащую домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида.

Как правило, любой тип культивируемой клеточной линии, включая перечисленные выше клеточные линии, можно применять в качестве основы для создания линий клеток-хозяев, предлагаемых в настоящем изобретении. В предпочтительном варианте осуществления изобретения СНО-клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышиной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER. С6-клетки или клетки гибридомы, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или растительные клетки используют в качестве основной клеточной линии для создания клеток-хозяев, предлагаемых в изобретении.

Изобретение относится к любым созданным клеткам-хозяевам, экспрессирующим полипептид, который обладает GnTIII-активностью, включая слитый полипептид, который несет домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида, как он определен выше.

Одну или несколько нукleinовых кислот, кодирующих полипептид, который обладает GnTIII-активностью, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или в другом варианте регулируемой экспрессионной системы. Такие системы хорошо известны в данной области, и они включают описанные выше системы. Если несколько различных нукleinовых кислот, кодирующих слитые полипептиды, которые обладают GnTIII-активностью и содержат домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида, входят в систему клетки-хозяина, то некоторые из них можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора, а другие экспрессировать под контролем регулируемого промотора. Уровни экспрессии слитых полипептидов, которые обладают GnTIII-активностью, определяют методами, хорошо известными в данной области, включая анализ методом Вестерн-блоттинга, методом Нозерн-блоттинга, анализ экспрессии репортерного гена или определение GnTIII-активности. В альтернативном варианте можно применять лектин, который связывается с продуктами биосинтеза GnTIII, например E<sub>4</sub>-PHA-лектина. В альтернативном варианте можно использовать функциональный анализ, который позволяет оценивать повышенную способность связываться с Fc-рецептором или повышенную эффекторную функцию, опосредованную антителами, которые получают путем создания клеток, несущих нукleinовую кислоту, которая кодирует полипептид, обладающий GnTIII-активностью.

Идентификация трансфектантов или трансформантов, которые экспрессируют белок, имеющий модифицированную схему гликозилирования.

Клетки-хозяева, которые содержат кодирующую последовательность химерной АСМ, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышиного антитела B-Ly1, и экспрессирует биологически активные генные продукты, можно модифицировать с помощью по меньшей мере четырех общих подходов, таких как (а) гибридизация ДНК-ДНК или ДНК-РНК; (б) наличие или отсутствие функций "маркерных" генов; (в) оценка уровня транскрипции в качестве меры экспрессии соответст-

вующих транскриптов мРНК в клетке-хозяине и (г) обнаружение генных продуктов с помощью иммунного анализа или по их биологической активности.

При использовании первого подхода присутствие кодирующей последовательности химерной АСМ, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, и кодирующей последовательности полипептида, который обладает GnTIII-активностью, можно определять с помощью гибридизации ДНК-ДНК или ДНК-РНК с использованием зондов, содержащих нуклеотидные последовательности, гомологичные соответствующим кодирующему последовательностям соответственно, или их фрагментам или производным.

При использовании второго подхода рекомбинантный экспрессионный вектор/систему хозяина можно идентифицировать и отбирать по присутствию или отсутствию функций определенных "маркерных" генов (например, тимидинкиназная активность, устойчивость к антибиотикам, устойчивость к метотрексату, трансформация фенотипа, образование включенных телец в бакуловирусах и т.д.). Например, если кодирующая последовательность АСМ, предлагаемой в изобретении, или ее фрагмент и кодирующую последовательность полипептида, который обладает GnTIII-активностью, встраивают в последовательность маркерного гена вектора, то рекомбинантные содержащие соответствующие кодирующие последовательности можно идентифицировать по отсутствию функции маркерного гена. В альтернативном варианте маркерный ген можно помещать в тандеме с кодирующими последовательностями под контроль одинаковых или различных промоторов, применяемых для контроля экспрессии кодирующих последовательностей. Экспрессия маркера в ответ на индукцию или селекцию свидетельствует об экспрессии кодирующей последовательности АСМ, предлагаемой в изобретении, и кодирующей последовательности полипептида, который обладает GnTIII-активностью.

При использовании третьего подхода транскрипционную активность кодирующей области АСМ, предлагаемой в изобретении, или ее фрагмента и кодирующей последовательности полипептида, который обладает GnTIII-активностью, можно оценивать с помощью гибридизации. Например, РНК можно выделять и анализировать с помощью Нозерн-блоттинга с использованием зонда, гомологичного кодирующему последовательностям АСМ, предлагаемым в изобретении, или их фрагментам, и кодирующей последовательности полипептида, обладающего GnTIII-активностью, или ее определенного фрагмента. В альтернативном варианте общие нуклеиновые кислоты клетки-хозяина можно экстрагировать и оценивать гибридизацию с указанными зондами.

При использовании четвертого подхода экспрессию белковых продуктов можно оценивать иммунологически, например, с помощью Вестерн-блоттинга, таких иммунологических анализов, как радиоиммунопреципитация, ферментные иммуноанализы и т.п. Однако конечный тест, позволяющий оценить эффективность системы экспрессии, включает определение биологически активных генных продуктов.

Получение и применение АСМ, которые обладают повышенной эффекторной функцией, такой как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения являются гликоформы химерных АСМ, которые имеют специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, и обладают повышенной эффекторной функцией, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность. Ранее описано создание определенной схемы гликозилирования антител (см., например, U.S. 6602684, содержание которого полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки).

Клинические опыты с использованием неконьюгированных моноклональных антител (МАт) для лечения некоторых типов рака в настоящее время дали обнадеживающие результаты (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12, 1997, с. 223-225; Deo и др., Immunology Today 18, 1997, с. 127). Химерный неконьюгированный IgG1 одобрен для применения при слабо дифференцированной или фолликулярной В-клеточной не-ходжкинской лимфоме (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12, 1997, с. 223-225), а при использовании другого неконьюгированного МАт, такого как гуманизированный IgG1, мишенью которого являются плотные опухоли, также получены многообещающие результаты на фазе III клинических опытов (Deo и др., Immunology Today 18, 1997, с. 127). Антигены двух указанных МАт характеризуются высоким уровнем экспрессии на соответствующих опухолевых клетках, и антитела опосредуют эффективное разрушение опухоли с помощью эффекторных клеток *in vitro* и *in vivo*. В противоположность этому многие другие неконьюгированные МАт, обладающие высокой специфичностью в отношении опухолей, не обладают способностью запускать эффекторные функции такого уровня, чтобы их можно было с успехом применять в клинических целях (Frost и др., Cancer 80, 1997, с. 317-333; Surfus и др., J. Immunother. 19, 1996, с. 184-191). В сочетании с такими менее эффективными МАт в настоящее время оценивали дополнительную терапию с использованием цитокинов. Добавление цитокинов может стимулировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) путем повышения активности и количества присутствующих в кровотоке лимфоцитов (Frost и др., Cancer 80, 1997, с. 317-333); Surfus и др., J. Immunother. 19, 1996, с. 184-191). ADCC, представляющую собой логическое воздействие на меченные антителом клетки, запускают связыванием рецепторов лейкоцитов с константной областью (Fc) антител (Deo и др., Immunology Today 18, 1997, с. 127).

Другой дополняющий подход к повышению ADCC-активности неконьюгированных IgG1 состоит в

конструировании Fc-области антитела. Опыты по конструированию белков позволили установить, что Fc $\gamma$ R взаимодействуют с меньшей шарнирной областью CH2-домена IgG (Lund и др., J. Immunol. 157, 1996, с. 4963-4969). Однако для связывания Fc $\gamma$ R также требуется присутствие олигосахаридов, ковалентно связанных с консервативным Asn 297 в CH2-области (Lund и др., J. Immunol. 157, 1996, с. 4963-4969; Wright и Mortison, Trends Biotech. 15, 1997, с. 26-31), это позволяет предположить либо, что олигосахарид и полипептид оба непосредственно принимают участие в сайте связывания, либо что для поддержания активной конформации CH2-полипептида требуется олигосахарид. Таким образом, модификацию структуры олигосахарида можно применять в качестве средства повышения аффинности взаимодействия.

Молекула IgG несет два N-связанных олигосахарида в Fc-области, по одному на каждой тяжелой цепи. Как любой гликопротеин антитела получают в виде популяции гликоформ, которые имеют одинаковый полипептидный каркас, но несут различные присоединенные к сайтам гликозилирования олигосахариды. Олигосахариды, которые, как правило, присутствуют в Fc-области сывороточного IgG, представляют собой комплекс олигосахаридов биантенного типа (Wormald и др., Biochemistry 36, 1997, с. 130-138) с низким уровнем концевой сиаловой кислоты и бисекционного N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), с различными уровнями концевого галактозилирования и корового фукозилирования. В некоторых исследованиях высказано предположение, что для Fc $\gamma$ R-связывания внутри олигосахаридного ядра требуется минимальная углеводная структура (Lund и др., J. Immunol. 157, 1996, с. 4963-4969).

В мышиных или хомячковых клеточных линиях, которые применяют в промышленности и научных исследованиях для получения неконьюгированных терапевтических МАт, как правило, присоединяют требуемые олигосахаридные детерминанты к Fc-сайтам. IgG, экспрессируемые этими клеточными линиями, не содержат бисекционные GlcNAc, обнаруженные в небольших количествах в сывороточных IgG (Lifely и др., Glycobiology 318, 1995, с. 813-822). В противоположность этому в настоящее время установлено, что некоторых из гликоформ крысиного продуцируемого миеломой гуманизированного IgG1 (CAMPATH-1H) несут бисекционный GlcNAc (Lifely и др., Glycobiology 318, 1995, с. 813-822). Полученное из крысиных клеток антитело достигает аналогичной максимальной ADCC-активности *in vitro*, что и антитела CAMPATH-1H, полученные в стандартных клеточных линиях, но при использовании существенно более низких концентраций антитела.

Антитело CAMPATH обычно присутствует в невысоких концентрациях на клетках лимфомы, а соответствующее химерное МАт обладает высокой ADCC-активностью в отсутствии бисекционного GlcNAc (Lifely и др., Glycobiology 318, 1995, с. 813-822). В N-связанном пути гликозилирования бисекционный GlcNAc добавляют с помощью GnTIII (Schachter, Biochem. Cell Biol. 64, 1986, с. 163-181).

В проведенных ранее экспериментах использовали одну антителопродуцирующую линию СНО-клеток, которая ранее была создана для экспрессии под воздействием внешней регуляции различных уровней клонированного гена фермента GnTIII (Umana P. и др., Nature Biotechnol. 17, 1999, с. 176-180). Этот подход прежде всего использовали для доказательства строгой корреляции между экспрессией GnTIII и ADCC-активностью модифицированного антитела. Таким образом, изобретение относится к рекомбинантному химерному антителу или его фрагменту, обладающему специфичностью связывания, практически соответствующей мышенному антителу B-Ly1, которое имеет измененную схему гликозилирования в результате повышенной GnTIII-активности. Повышенная GnTIII-активность приводит к повышению процентного содержания бисекционных олигосахаридов, а также к снижению процентного содержания фукозных остатков в Fc-области ACM. Это антитело или его фрагмент обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией. Кроме того, изобретение относится к фрагменту антитела и слитым белкам, которые содержат область, эквивалентную Fc-области иммуноглобулина.

Терапевтическое применение ACM, полученных с помощью способов, предлагаемых в изобретении.

ACM, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять индивидуально для мечения и уничтожения опухолевых клеток *in vivo*. ACM можно использовать также в сочетании с соответствующим терапевтическим агентом для лечения карциномы человека. Например, ACM можно применять в сочетании со стандартными или общепринятыми методами лечения, такими как химиотерапия, лучевая терапия, или их можно коньюгировать или связывать с терапевтическим лекарственным средством или токсином, а также с лимфокином или ингибирующим рост опухоли фактором для введения терапевтического агента в область карциномы. Наиболее важными коньюгатами ACM, предлагаемых в настоящем изобретении, являются (1) иммунотоксины (коньюгаты ACM и цитотоксического фрагмента) и (2) меченные (например, меченные с помощью радиоактивного изотопа, меченные с помощью фермента или меченные с помощью флуорорхрома) ACM, в которых метка является средством идентификации иммунных комплексов, включающих меченную ACM. ACM можно применять также для индукции лизиса посредством встречающегося в естественных условиях связанныго с комплементом процесса и для взаимодействия с существующей в норме антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью.

Цитотоксический фрагмент иммунотоксина может представлять собой цитотоксическое лекарст-

венное средство или ферментативно активный токсин бактериального или растительного происхождения, или ферментативно активный фрагмент ("А-цепь") такого токсина. Применяемые ферментативно активные токсины и их фрагменты представляют собой А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модесцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин. В другом варианте осуществления изобретения ACM конъюгируют с небольшой молекулой противоракового лекарственного средства. Коньюгаты ACM и таких цитотоксических фрагментов получают с помощью разнообразных бифункциональных белковых связывающих агентов. Примерами таких реагентов являются SPDP, IT, бифункциональные производные сложных имидозифиров, таких как диметиладипимиат×HCl, активные сложные эфиры, такие как дисукцинимидсуберат, альдегиды, такие как глутаровый альдегид, бисазидосоединения, такие как бис-(пара-азидобензоил)гександиамин, производные бисдиазония, такие как бис-(пара-диазонийбензоил)этилендиамин, диизоцианаты, такие как толилен-2,6-диизоцианат, и бисактивные соединения фтора, такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол. Лизирующий фрагмент токсина можно соединять с Fab-фрагментом ACM. Дополнительные приемлемые токсины известны в данной области, например описаны в опубликованной заявке на патент США № 2002/0128448, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном из вариантов осуществления изобретения химерную ACM с сконструированной схемой гликозилирования, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1, конъюгируют с А-цепью рицина. В наиболее предпочтительном варианте А-цепь рицина дегликозилируют и получают с помощью рекомбинации. Предпочтительный метод получения иммunoоксина рицина описан у Vitetta и др., *Science* 238, 1987, с. 1098), публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки.

При применении для уничтожения опухолевых клеток у человека *in vitro* для диагностических целей коньюгаты, как правило, добавляют в среду для культивирования клеток в концентрации по меньшей мере примерно 10 нМ. Препартивная форма и путь введения *in vitro* не имеют решающего значения. Как правило, можно использовать водные композиции, которые совместимы со средой для культивирования или перфузии. Цитотоксичность можно оценивать с помощью общепринятых методов, предназначенных для определения наличия или степени развития рака.

Как указано выше, цитотоксический радиофармацевтический агент, предназначенный для лечения рака, можно приготавливать путем коньюгации радиоактивного изотопа (например, I, Y, Pr) с химерной ACM со сконструированной схемой гликозилирования, которая имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышного антитела B-Ly1. Подразумевается, что понятие "цитотоксический фрагмент" в контексте настоящего описания относится также к таким изотопам.

В другом варианте осуществления изобретения в липосомы вносят цитотоксическое лекарственное средство и на липосомы наносят ACM, предлагаемые в настоящем изобретении. Поскольку на поверхности злокачественных В-клеток присутствует множество молекул CD20, этот метод позволяет осуществлять введение больших количеств лекарственного средства к клеткам требуемого (правильного) типа.

Методы получения коньюгатов таких указанных терапевтических агентов и антител хорошо известны (см., например, Arnon и др., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, под ред. Reisfeld и др., изд-во Alan R. Liss, Inc., 1985, с. 243-256); Hellstrom и др., "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery* (2-е изд.), под ред. Robinson и др., изд-во Marcel Dekker, Inc., 1987, с. 623-653; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, под ред. Pinchera и др., 1985, с. 475-506 и Thorpe и др., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62, 1982, с. 119-158).

Другими терапевтическими применениями ACM, предлагаемых в изобретении, является коньюгация или связывание, например, с помощью рекомбинантной ДНК, с ферментом, который обладает способностью превращать пролекарство в цитотоксическое лекарственное средство, и применение коньюгата антитело-фермент в сочетании с пролекарством для превращения пролекарства в цитотоксический агент в области опухоли (см., например, Senter и др., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1988, с. 4842-4846; "Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49, 1989, с. 5789-5792 и Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy", *FASEB J.* 4, 1990, с. 188-193).

Следующим терапевтическим применением ACM, предлагаемых в изобретении, является применение либо в неконьюгированной форме в присутствии комплемента, либо в виде фрагмента коньюгата антитело-лекарственное средство или антитело-токсин, для удаления опухолевых клеток из костного мозга страдающих раком пациентов. При таком подходе аутологичный костный мозг можно очищать *ex vivo* обработкой антителом и возвращать мозг путем инфузии в организм пациента [см., например, Ramsay и др., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8(2), 1988, с. 81-88].

Изобретение относится также к одноцепочечному иммунотоксину, содержащему антигенсвязывающие центры, которые обладают практически такой же специфичностью связывания, что и мышьюное антитело B-Ly1 (например, полипептиды, которые содержат CDR мышьюного антитела B-Ly1), и содержащему также токсичный полипептид. Одноцепочечные иммунотоксины, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения человеческой саркомы *in vivo*.

Аналогично этому для лечения человеческой саркомы *in vivo* можно применять слитый белок, содержащий по меньшей мере одну антигенсвязывающую область ACM, предлагаемой в изобретении, сцепленную по меньшей мере с одной функционально активной областью второго белка, обладающего противоопухолевой активностью, например лимфокином или онкостатином.

В настоящем изобретении предложен способ избирательного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD20. Этот способ предусматривает взаимодействие иммуноконъюгата (например, иммунотоксина), предлагаемого в изобретении, с указанными опухолевыми клетками. Эти опухолевые клетки могут представлять собой клетки человеческой карциномы.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения карциномы (например, человеческих карцином) *in vivo*. Этот способ заключается в том, что пациенту вводят терапевтически эффективное количество композиции, содержащей по меньшей мере один иммуноконъюгат (например, иммунотоксин), предлагаемый в изобретении.

Следующим объектом изобретения является улучшенный способ лечения В-клеточных пролиферативных нарушений, включая В-клеточную лимфому, а также аутоиммунного заболевания, частично или полностью вызванного патогенными аутоантителами, основой которого является В-клеточное "истощение", заключающийся в том, что человеку, который нуждается в этом, вводят терапевтически эффективное количество ACM, предлагаемой в настоящем изобретении. В предпочтительном варианте осуществления изобретения ACM представляет собой антитело к CD20 со сконструированной схемой гликозилирования, которое обладает практически такой же специфичностью связывания, что и мышьюное антитело B-Ly1. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело является гуманизированным. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают (но не ограничиваясь ими) иммунные тромбоцитопении, такие как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпуря и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпуря, дерматомиозит, хорею Сиденгама, волчанковый нефрит, ревматическую атаку, плориглануллярные синдромы, геморрагический васкулит (болезнь Шенлейна-Геноха), нефрит после стрептококковой инфекции, нодозную эритему, артериит Такаясу, болезнь Аддисона, многоформную эритему, нодозный полиартрит, анкилозирующий спонделит, синдром Гудпасчера, тромбангиит облитерирующий, первичный билиарный цирроз, тиротоксикоз, хронический активный гепатит, полимиозит/дерматомиозит, полихондрит, памфигит обыкновенный (*ramphigus vulgaris*), гранулематоз Вегенера, мембранные нефропатии, боковой амиотрофический склероз, сухотку спинного мозга, полимиалгии, пернициозную анемию, быстро прогрессирующий гломерулонефрит и фиброзный альвеолит, воспалительные реакции, такие как воспалительные кожные заболевания, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); системную склеродермию и склероз; реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такие как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; РДСВ); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, связанные с Т-клеточной инфильтрацией и хроническими воспалительными реакциями; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (СКВ); сахарный диабет (например, сахарный диабет типа 1 или инсулинависимый сахарный диабет); рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; юношеский диабет; и иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, что обычно наблюдается при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); болезни, включающие диапедез лимфоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром поражения множества органов; гемолитическую анемию (включая (но не ограничиваясь ими) криоглобинемию или анемию Куумба (*Coombs positive anemia*)); тяжелую псевдопаралитическую хромоту; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело; заболевание, повреждающее клубочковую базальную мембрану; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Лэмбера-Итона; буллезный пемфигоид; пузырьчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром негнущегося человека; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунный комплексный нефрит; IgA-нефропатию; IgM-полинейропатию; иммунную тромбоцитопеническую пурпурю (ITP) или аутоиммунную тромбоцитопению и т.д. Согласно одному из объектов изобретения ACM, предлагаемые в изобретении, применяют для "истощения" находящихся в кровотоке здоровых В-клеток в течения пролонгированного периода времени.

Настоящее изобретение можно применять для лечения пациентов, которые могут представлять собой человека, лошадь, свинью, быка, мышь, собаку, кошку и птиц. Другие теплокровные животные также подпадают под объем настоящего изобретения.

Объектом изобретения являются также способы ингибирования роста человеческих опухолевых клеток, лечения опухоли у пациента и лечение заболеваний пролиферативного типа у пациента. Эти способы заключаются в том, что пациенту вводят эффективное количество композиции, предлагаемой в изобретении.

Таким образом, очевидно, что настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, комбинациям и способам лечения человеческих карцином, таких как В-клеточная лимфома. Например, изобретение относится к фармацевтическим композициям, предназначенным для применения при лечении человеческих карцином, которые содержат фармацевтически эффективное количество антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Содержащие ACM композиции, предлагаемые в изобретении, можно вводить общепринятыми путями, включая (но не ограничиваясь ими) внутривенное, внутрибрюшинное, оральное, внутрилимфатическое введение или введение непосредственно в опухоль. Предпочтительным является внутривенное введение.

Согласно одному из объектов изобретения терапевтические композиции, которые содержат ACM, предлагаемые в изобретении, готовят в предназначенной для хранения форме путем смешения антитела, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксквициентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, эксквициенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и представляют собой буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид, бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарафены, такие как метил- или пропилпарафен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); низкомолекулярные (состоящие менее чем примерно из 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахарида, дисахарида и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры композиций ACM в виде антител к CD20 описаны в WO 98/56418, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки. В этой публикации описана жидккая композиция, включающая несколько доз, которая содержит 40 мг/мл ритуксимаба, 25 мМ ацетат, 150 мМ трегалозу, 0,9% бензилового спирта, 0,02% полисорбата 20, pH 5,0, минимальный срок годности которой составляет 2 года при хранении при 2-8°C. Другая содержащая антитело к CD20 представляющая интерес композиция содержит 10 мг/мл ритуксимаба в смеси, включающей 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильную воду для инъекций, pH 6,5. В настоящем изобретении и вместо RITUXAN® применяли ACM, предлагаемую в настоящем изобретении.

Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны в WO 97/04801. Такие лиофилизированные композиции можно восстанавливать с помощью пригодного разбавителя с получением высокой концентрации белка и восстановленную композицию можно вводить подкожно подлежащему лечению млекопитающему.

Композиции, предлагаемые в изобретении, могут содержать также более одного действующего вещества, необходимого для лечения конкретного показания, которое предпочтительно обладает дополнительными видами активности, и они не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Например, может требоваться введение дополнительного цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитокина или иммуносупрессорного агента (например, оказывающего действие на Т-клетки, такого как циклоспорин или антитело, связывающееся в Т-клетками, например связывающееся с LFA-1). Эффективное количество указанных дополнительных агентов зависит от количества антагониста, присутствующего в композиции, типа заболевания или нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием тех же путей введения, которые указаны выше, или в дозе, составляющей примерно 1-99% от применяемых доз.

Действующие вещества могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или с помощью межфазной полимеризации, например в микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и полигидроксилметилметакрилатные микрокапсулы соответственно, в коллоидных системах для введения лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросфера, микроэмulsionи, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмulsionи. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980.

Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Соответствующими примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидро-

фобных полимеров, содержащих антагонист, эти матрицы могут представлять собой изделия, имеющие определенную форму, например пленок или микрокапсул. Примерами матриц в препаратах с пролонгированным высвобождением являются сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (U.S. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, неразложимые сополимеры этилена и винилацетата, разложимые сополимеры молочной кислоты и гликоловой кислоты, такие как LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (инъектируемые микрокапсулы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликоловой кислоты и леупролид-ацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

Составы, предназначенные для применения *in vivo*, должны быть стерильными. Для этой цели принято использовать фильтрацию через стерильные фильтрационные мембранны.

Композиции, предлагаемые в изобретении, могут представлять собой различные формы лекарственных средств, включая (но не ограничиваясь ими) жидкие растворы или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, суппозитории, полимерные микрокапсулы или микропузырьки, липосомы и вводимые путем инъекции или инфузии растворы. Предпочтительная форма зависит от пути введения и терапевтического применения.

Композиции, предлагаемые в изобретении, предпочтительно включают также общепринятые фармацевтически приемлемые носители и адьюванты, известные в данной области, такие как человеческий сывороточный альбумин, ионообменники, квасцы, лецитин, буферы, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия и соли или электролиты, такие как сульфат протамина.

Наиболее эффективный путь введения и схема приема лекарственного средства для фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, зависит от серьезности и течения заболевания, состояния здоровья пациента и его реакции на лечение, и их определяет лечащий врач. Такие дозы композиций должны быть подобраны для каждого пациента. Однако эффективная доза композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, как правило, составляют от примерно 0,01 до примерно 2000 мг/кг.

Представленные в настоящем описании молекулы могут входить в состав различных форм лекарственных средств, включая (но не ограничиваясь ими) жидкие растворы или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, суппозитории, полимерные микрокапсулы или микропузырьки, липосомы и вводимые путем инъекции или инфузии растворы. Предпочтительная форма зависит от пути введения и терапевтического применения.

Композиции, содержащие АСМ, предлагаемую в настоящем изобретении, можно приготавливать, дозировать и вводить путями, соответствующими высокоеффективной медицинской практике. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное заболевание или нарушение, подлежащее лечению, конкретное мlekопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, течение болезни или нарушения, область введения агента, метод введения, схема применения и другие факторы, известные практикующим специалистам-медикам. Терапевтически эффективное количество антагониста, подлежащее введению, должно определяться этими факторами.

В соответствии с общепринятыми положениями терапевтически эффективное количество антитела на дозу при парентеральном введении должно составлять примерно 0,1-20 мг/кг веса тела пациента в день, при этом обычные начальные дозы применяемого антагониста составляют примерно 2-10 мг/кг.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения АСМ представляет собой антитело, предпочтительно гуманизированное антитело. Приемлемые дозы такого неконьюнигированного антитела составляют, например, от примерно 20 до примерно 1000 мг/м<sup>2</sup>. В одном из вариантов осуществления изобретения доза антитела отличается от дозы, рекомендованной в настоящее время для RITUXAN<sup>®</sup>. Например, пациенту можно вводить одну или несколько доз антитела, которые существенного ниже 375 мг/м<sup>2</sup>, например доза может составлять от примерно 20 до примерно 250 мг/м<sup>2</sup>, например от примерно 50 до примерно 200 мг/м<sup>2</sup>.

Кроме того, антитело можно вводить в виде одной или нескольких начальных доз с последующим введением еще одной или нескольких доз антитела, при этом дозы антитела (в мг/м<sup>2</sup>) в последующих дозах превышают начальную(ые) дозу(ы) антитела (в мг/м<sup>2</sup>). Например, начальная доза может составлять от примерно 20 до примерно 250 мг/м<sup>2</sup> (например, от примерно 50 до примерно 200 мг/м<sup>2</sup>), а последующие дозы могут составлять от примерно 250 до примерно 1000 мг/м<sup>2</sup>.

Однако, как отмечалось выше, эти предполагаемые количества АСМ могут в значительной степени подвергаться терапевтической корректировке. Фактор, имеющий решающее значение для выбора соответствующей дозы и схемы применения лекарственного средства, является результатом, полученным с помощью описанных выше параметров. Например, относительно более высокие дозы могут требоватьсяся, прежде всего, для лечения заболеваний на начальной стадии и острых заболеваний. Для получения наиболее эффективных результатов, в зависимости от заболевания или нарушения, антагонист вводят максимально быстро к моменту появления первого симптома, диагноза, проявления или возникновения заболевания или нарушения или во время ремиссии заболевания или нарушения.

АСМ, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят с помощью приемлемых путей, включая па-

рентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если это требуется для местного иммуносупрессорного лечения, вводят в область повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антагонист можно вводить с помощью импульсной инфузии, например, используя понижающиеся дозы антагониста. Предпочтительно введение дозы осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в частности, в зависимости от того является ли введение кратковременным или продолжительным.

Согласно изобретению в сочетании с указанными антагонистами можно вводить другие соединения, такие как цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, иммуносупрессоры и/или цитокины. Комбинированное введение предусматривает совместное введение с использованием различных композиций или с использованием одной фармацевтической композиции или последовательное введение в любом порядке, при этом предпочтительно в течение периода времени, когда оба (или все) действующих вещества одновременно проявляют их биологическую активность.

Должно быть очевидно, что дозу композиции, предлагаемой в изобретении, которая необходима для достижения лечебного действия, можно дополнительно снижать путем оптимизации схемы приема лекарственного средства.

При практическом воплощении изобретения фармацевтический носитель может представлять собой липидный носитель. Липидный носитель может представлять собой фосфолипид. Кроме того, липидный носитель может представлять собой жирную кислоту. Липидный носитель может представлять собой также дeterгент. В контексте настоящего описания дeterгент представляет собой любое вещество, которое изменяет поверхностное натяжение жидкости, как правило, снижая его.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения дeterгент может представлять собой неионный дeterгент. Примеры неионных дeterгентов включают (но не ограничиваясь ими) полисорбат 80 (известный также под названием Твин 80 или полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат), Brj и Тритон (например, Тритон WR-1339 и Тритон А-20).

В другом варианте дeterгент может представлять собой ионный дeterгент. Примеры ионных дeterгентов включают (но не ограничиваясь им) алкилтриметиламмонийбромид.

Кроме того, согласно изобретению липидный носитель может представлять собой липосому. В контексте настоящего описания "липосома" обозначает любой связанный с мембраной пузырек, который содержит любые молекулы, предлагаемые в изобретении, или их комбинации.

Ниже изобретение проиллюстрировано более подробно с помощью примеров. Приведенные ниже препараты и примеры даны для того, чтобы настоящее изобретение стало более понятным специалистам в данной области, и они могли осуществить его практическое воплощение. Однако приведенные в качестве примеров варианты осуществления изобретения не ограничивают его объем, они приведены только с целью иллюстрации некоторых объектов настоящего изобретения и функционально эквивалентных способов, заявляемых в изобретении. Различные модификации изобретения, помимо приведенных в настоящем описании, должны стать очевидными специалистам в данной области после ознакомления с приведенным выше описанием и прилагаемыми к нему чертежами. Такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

### Примеры

[Примечание: если не указано иное, то в приведенных ниже примерах нумерация положений конкретных аминокислотных остатков дана согласно системе нумерации Кэбота.]

Пример 1.

Материалы и методы.

Клонирование и экспрессия рекомбинантного антитела B-Ly1.

Клетки гибридомы, экспрессирующие B-Ly1, выращивали в среде RPMI, содержащей 10% FBS и 4 mM L-глутамин. Собирали  $6 \times 10^6$  клеток с жизнеспособностью > 90% и выделяли общую РНК с использованием набора типа Qiagen RNAeasy midi. кДНК, кодирующие вариабельные области легкой и тяжелой цепей B-Ly1 амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР осуществляли с использованием следующих условий: 30 мин при 50°C для синтеза первой цепи кДНК; начальная денатурация в течение 15 мин при 95°C; 30 циклов по 1 мин при 94°C, 1 мин при 45°C, 1,5 мин при 72°C; и конечная стадия удлинения в течение 10 мин при 72°C. Ожидаемый размер ПЦР-продуктов подтверждали с помощью гель-электрофореза. ПЦР-продукты клонировали в пригодных для E. coli векторах и путем секвенирования ДНК подтверждали, что были выделены гены, кодирующие вариабельную область легкой и тяжелой цепи.

Для конструирования экспрессионных векторов для химерного B-Ly1 синтетические сигнальные последовательности и соответствующие сайты рестрикциисливали с вариабельными областями цепей с помощью дополнительных ПЦР. После окончательного подтверждения правильности последовательности ДНК вариабельных областей цепей их объединяли с соответствующими константными областями человеческого IgG1. После создания генов их клонировали под контролем промотора MPSV и против хода транскрипции относительно синтетического сайта полиденилирования (polyA) с использованием двух отдельных векторов, по одному для каждой цепи, в результате чего получали плазмиду pETR1808

(экспрессионный вектор для тяжелой цепи) и pETR1813 (экспрессионный вектор для легкой цепи). Каждый вектор нес последовательность OriP EBV.

Химерное B-Ly1 конструировали путем котрансфекции клеток линии HEK293-EBNA векторами pETR1808 и pETR1813 с помощью метода трансфекции, основанного на использовании фосфата кальция. Клетки линии HEK293-EBNA на экспоненциальной фазе роста трансфектировали с помощью метода трансфекции, основанного на использовании фосфата кальция. Клетки выращивали в виде адгезионных монослоистых культур в Т-колбах с использованием среды для культивирования DMEM, дополненной 10% FCS, и осуществляли трансфекцию, когда они достигали 50-80%-ной конфлюэнтности. Для трансфекции T75-колбы 8 млн клеток высевали за 24 ч до трансфекции в 14 мл среды для культивирования DMEM, дополненной FCS (в конечной концентрации 10 об.%), 250 мкг/мл неомицина, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Для каждой используемой для трансфекции T75-колбы приготавливали раствор, содержащий ДНК, CaCl<sub>2</sub> и воду, путем смешения 47 мкг общей плазмидной векторной ДНК, взятой в виде равных долей экспрессионных векторов для легкой и тяжелой цепей, 235 мкг 1 М раствора CaCl<sub>2</sub> и добавления воды до конечного объема 469 мкл. К этому раствору добавляли 469 мкл 50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ раствор Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05, сразу перемешивали в течение 10 с и давали выстояться при комнатной температуре в течение 20 с. Суспензию разбавляли 12 мл DMEM, дополненной 2% FCS, и вносили в колбу T75 вместо существующей среды. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение примерно 17-20 ч, затем среду заменяли 12 мл DMEM, 10% FCS. Для продуцирования немодифицированного антитела "chB-Ly1" клетки трансфектировали только экспрессионными векторами для антитела pETR1808 и pETR1813, взятыми в соотношении 1:1. Для продуцирования антитела "chB-Ly1-ge", имеющего сконструированную схему гликозилирования, клетки котрансфектировали четырьмя плазмидами, двумя для экспрессии антитела (pETR1808 и pETR1813), одной для экспрессии слитого полипептида GnTIII (pETR1519) и одной для экспрессии маннозидазы II (pCLF9), взятыми в соотношении 4:4:1:1 соответственно. В день 5 после трансфекции супернатант собирали, центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин, а затем второй раз центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин и выдерживали при 4°C.

Антитела chB-Ly1 и chB-Ly1-ge очищали из супернатанта культуры с помощью трех последовательных стадий хроматографии, а именно хроматографии на протеине A, катионообменной хроматографии и гель-фильтрации на Superdex 200-колонке (фирма Amersham Pharmacia), заменяя буфер на солевой фосфатный буфер и собирая полученный на этой последней стадии пик мономерного антитела. Концентрацию антитела определяли с помощью спектрофотометра, измеряя абсорбцию при длине волны 280 нм.

#### Анализ олигосахаридов.

Олигосахариды высвобождали ферментативным путем из антитела путем расщепления PNG-азой-F, причем антитела либо были иммобилизованы на ПВДФ (поливинилидендифторид)-мембране, либо находились в растворе.

Полученный после расщепления раствор, содержащий высвобожденные олигосахариды, либо использовали непосредственно для MALDI/TOF-МС-анализа, либо осуществляли дополнительное расщепление с помощью глюкозидазы EndoH перед приготовлением образца для MALDI/TOF-МС-анализа.

#### Метод высвобождения олигосахаридов для антител, иммобилизованных на ПВДФ-мембране

Лунки 96-луночного планшета из ПВДФ-мембраны (типа Immobilon P, фирма Millipore, Бэдфорд, шт. Массачусетс) смачивали 100 мкл метанола и жидкость отсасывали через ПВДФ-мембрану с помощью вакуума, создаваемого в вакуумном многомембранным коллекторе (типа Millipore, Бэдфорд, шт. Массачусетс). ПВДФ-мембранны трижды промывали 300 мкл воды. Затем лунки промывали 50 мкл RCM-буфера (8 М мочевина, 360 мМ Трис, 3,2 мМ ЭДТК, pH 8,6). 30-40 мкг антитела вносили в лунку, содержащую 10 мкл RCM-буфера. Жидкость в лунке отсасывали через мембрану путем создания вакуума и мембрану последовательно дважды промывали 50 мкл RCM-буфера. Восстановление дисульфидных мостиков осуществляли путем добавления 50 мкл 0,1 М дитиотреитола в RCM и инкубации при 37°C в течение 1 ч.

После восстановления создавали вакуум для удаления дитиотреитола из лунки. Лунки трижды промывали 300 мкл воды, после чего осуществляли карбоксиметилирование цистеиновых остатков путем добавления 50 мкл 0,1 М йодуксусной кислоты в RCM-буфере и инкубации при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин.

После карбоксиметилирования жидкость из лунок отсасывали с помощью вакуума и последовательно трижды промывали 300 мкл воды. Затем ПВДФ-мембрану блокировали для предупреждения адсорбции эндолюкозидазы путем инкубирования 100 мкл 1%-ного водного раствора поливинилпирролидона 360 при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого блокирующий реагент удаляли с помощью слабого вакуума и последующей трехкратной промывки 300 мкл воды.

N-связанные олигосахариды высвобождали путем добавления 2,5 мкг пептид-N-гликозидазы F (реекомбинантная N-гликаназа, фирма GLYKO, Новато, шт. Калифорния) и 0,1 мкг сиалидазы (фирма GLYKO, Новато, шт. Калифорния) для удаления любых возможных заряженных остатков моносахаридов в конечном объеме 25 мкл в 20 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,0). Расщепление осуществляли в течение 3 ч при 37°C.

Метод высвобождения олигосахаридов для антител, находящихся в растворе.

40-50 мкг антитела смешивали с 2,5 мкг PNG-азы-F (фирма Glyko, США) в 2 мМ Трис, pH 7,0 в конечном объеме 25 мкл и смесь инкубировали в течение 3 ч при 37°C.

Использование расщепления с помощью эндоглюкозидазы Н высвобожденных с помощью PNG-азы-F олигосахаридов для определения соответствия структур гибридных бисекционных олигосахаридов пикам нейтральных олигосахаридов, полученных методом MALDI/TOF-МС.

Высвобожденные с помощью PNG-азы-F олигосахариды затем расщепляли с помощью эндогликозидазы Н (КФ 3.2.1.96). Для осуществления расщепления с помощью EndoH добавляли 15 мкг EndoH (фирма Roche, Швейцария) к продукту расщепления PNG-азой-F (описанный выше метод для антитела, находящегося в растворе), получая конечный объем 30 мкл, и смесь инкубировали в течение 3 ч при 37°C. EndoH осуществляет расщепление между N-ацетилглюкозаминовыми остатками хитобиозного ядра N-связанных олигосахаридов. Фермент может расщеплять только олигоманнозу и большинство гибридных типов гликанов, в то время как олигосахариды комплексного типа не гидролизуются.

Приготовление образца для MALDI/TOF-МС.

Продукты ферментативного расщепления, содержащие высвобожденные олигосахариды, после добавления уксусной кислоты до конечной концентрации 150 мМ инкубировали еще в течение 3 ч при комнатной температуре и затем пропускали через 0,6 мл катионообменной смолы (смола AG50W-X8, гидрированная форма, 100-200 меш, фирма BioRad, Швейцария) упакованной в микро-био-спиновую хроматографическую колонку (фирма BioRad, Швейцария), для удаления катионов и белков. 1 мкл полученного образца наносили на пластину-мишень из нержавеющей стали и смешивали на пластине с 1 мкл sDHB-матрицы. SDHB-матрицу получали путем растворения 2 мг 2,5-дигидроксибензойной кислоты и 0,1 мг 5-метоксисалициловой кислоты в 1 мл смеси этанол/10 мМ водный раствор хлорида натрия 1:1 (об./об.). Образцы сушили на воздухе, наносили 0,2 мкл этанола и образцам давали окончательно перекристаллизоваться на воздухе.

MALDI/TOF-МС.

Для получения масс-спектров применяли MALDI-TOF-масс-спектрометр типа Voyager Elite (фирма Perspective Biosystems). Прибор работал в линейной конфигурации при ускоряющем напряжении 20 кВ и с временем задержки 80 нс. Для определения массы ионов применяли внешнюю калибровку с использованием олигосахаридных стандартов. Для получения окончательного спектра суммировали спектры, полученные при 200 лазерных импульсах.

В-клеточное истощение цельной крови.

Аликовты по 495 мкл гепаринизированной крови от здорового донора в 5 мл полистироловые пробирки, добавляли по 5 мкл 100-кратно концентрированных образцов антитела (конечная концентрация 1-1000 нг/мл) или только ЗФР и пробирки инкубировали при 37°. Через 24 ч 50 мкл крови переносили в свежие пробирку и окрашивали коньюгированным с флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC) антителом к CD3, коньюгированным с PE (фосфатидилэтаноламин) антителом к CD19 и коньюгированным с Cy-Chrome (Becton-Dickinson) антителом к CD45 в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Перед анализом в пробирки добавляли по 500 мкл FACS-буфера (ЗФР, содержащий 2% FCS и 5 мМ ЭДТК). Флуоресценцию CD3-FITC и CD19-PE в образцах крови анализировали с помощью проточной цитометрии, принимая за пороговое значение флуоресценцию CD45-CyChrome. В-клеточное истощение определяли на основе графика соотношения количества CD19<sup>+</sup> В-клеток и количества CD3<sup>+</sup> Т-клеток.

Связывание антител к CD20 с клетками линии Raji.

500000 клеток в 180 мкл FACS-буфера (ЗФР, содержащий 2% FCS и 5 мМ ЭДТК) переносили в 5 мл полистироловые пробирки, добавляли по 20 мкл 10-кратно концентрированных образцов антитела к CD20 (конечная концентрация 1-5000 нг/мл) или только ЗФР и пробирки инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем образцы промывали дважды FACS-буфером и пеллетировали при 300×g в течение 3 мин. Супернатант удаляли путем аспирации и клетки растворяли в 100 мкл FACS-буфера, добавляли 1 мкл F(ab')<sub>2</sub>-FITC-фрагментов, специфических в отношении Fc (фирма Jackson Immuno Research Laboratories, США) и пробирки инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Образцы промывали дважды FACS-буфером и растворяли в 500 мкл FACS-буфера, содержащего 0,5 мкл/мл ингибитора протеаз (PI), для анализа с помощью проточной цитометрии. Связывание оценивали путем построения графика зависимости средней геометрической величины флуоресценции от концентраций антитела.

Пример 2. Подход с использованием акцептора с высокой степенью гомологии.

Поиск каркасного участка антитела-акцептора с высокой степенью гомологии проводили на основе сравнительного анализа белковой последовательности мышоного B-ly1 и коллекцией последовательностей человеческой зародышевой линии и отбора той человеческой последовательности, которая обладала наибольшей степенью идентичности последовательности. В результате этого последовательность VH1\_10 из базы данных VBase была выбрана в качестве акцепторной каркасной последовательности тяжелой цепи, а последовательность VK\_2\_40 была выбрана в качестве акцепторной каркасной последовательности легкой цепи. В эти два акцепторных каркаса трансплантировали (встраивали) три гипервариабельных участка (CDR) вариабельных областей мышоной тяжелой и легкой цепей. Поскольку каркасный участок 4 не являлся частью гена вариабельной области V зародышевой линии, сравнительный анализ

для этого положения проводили индивидуально. Для тяжелой цепи выбирали участок JH4, а для легкой цепи выбирали участок JK4. Молекулярное моделирование сконструированного домена иммуноглобулина позволило выявить одно положение за пределами CDR, в котором потенциально возможно заменять человеческие аминокислотные остатки на мышиные. Повторная интродукция мышиных аминокислотных остатков в человеческий каркасный участок должна вызывать так называемые обратные мутации. Например, человеческий акцепторный аминокислотный остаток в положении 27 (по Кэботу) подвергали обратной мутации с заменой на остаток тирозина. Конструировали варианты гуманизированного антитела, которые либо включали, либо не включали обратные мутации. Легкая цепь гуманизированного антитела не требовала наличия никаких обратных мутаций. После создания белковых последовательностей синтезировали последовательности ДНК, кодирующие эти белки, согласно описанному ниже методу.

Подход, основанный на использовании смешанного каркасного участка.

Для того чтобы избежать интродукции обратных мутаций в имеющие решающее значение положения аминокислотных остатков (имеющих решающее значение для сохранения высокой аффинности в отношении связывания с антигеном или функций антитела) в человеческом акцепторном каркасном участке, проводили исследование того, можно ли весь каркасный участок 1 (FR1) или каркасные участки 1 (FR1) и 2 (FR2) вместе заменять последовательностями человеческого антитела, уже несущими донорные остатки, или их функциональными вариантами, в этих важных положениях встречающейся в естественных условиях человеческой последовательности зародышевой линии. Для этой цели проводили индивидуальный сравнительный анализ каркасных участков 1 и 2 последовательности VH мышного Bly1 и человеческих последовательностей зародышевой линии. В данном случае максимально высокая степень идентичности последовательностей была не важна и ее не использовали при выборе акцепторных каркасных участков, предполагалось, что вместо этого более важным являлось совпадение нескольких остатков, имеющих решающее значение. К таким имеющим решающее значение остаткам относятся остатки 24, 71 и 94 (нумерация согласно Кэботу), а также остатки в положениях 27, 28 и 30 (нумерация согласно Кэботу), которые расположены вне CDR1 согласно Кэботу, но которые часто принимают участие в связывании с антигеном. В качестве пригодной IMGT-последовательности была выбрана VH3\_1\_5. После создания белковых последовательностей синтезировали последовательности ДНК, кодирующие эти белки, согласно описанному ниже методу. При использовании указанного подхода для сохранения высоких уровней связывания с антигеном не требовались обратные мутации ни для легкой, ни для тяжелой цепи.

Синтез генов антитела.

После создания аминокислотной последовательности V-области гуманизированного антитела конструировали последовательность ДНК. Данные для последовательностей ДНК индивидуальных каркасных участков получали из баз данных последовательностей человеческой зародышевой линии. Последовательности ДНК CDR-участков получали из соответствующих данных мышиных кДНК. С использованием этих последовательностей создавали полную виртуальную последовательность ДНК. С учетом данных об этой последовательности ДНК в виртуальную последовательность интродуцировали диагностические сайты рестрикций, создавая путем интродукции "молчащих" мутаций сайты, распознаваемые рестриктазами. Для получения физической цепи ДНК осуществляли синтез гена (например, согласно методу, описанному Wheeler и др. 1995). С помощью этого метода на основе представляющих интерес генов создавали олигонуклеотиды таким образом, что одну серию олигонуклеотидов получали из кодирующей цепи, другую серию - из некодирующей цепи. 3'- и 5'-концы каждого олигонуклеотида (за исключением самого первого и самого последнего в ряду) всегда имели комплементарные последовательности для двух праймеров, полученных из другой цепи. Когда эти олигонуклеотиды помещали в реакционный буфер, пригодный для любой термостойкой полимеразы, и добавляли Mg<sup>2+</sup>, дНТФ и ДНК-полимеразу, то происходило удлинение каждого олигонуклеотида на его 3'-конце. Затем новый образовавшийся 3'-конец одного праймера отжигали со следующим праймером другой цепи и проводили дальнейшее удлинение его последовательности в условиях, пригодных для зависящего от матрицы удлинения цепи ДНК. Конечный продукт клонировали в пригодном векторе для размножения в E. coli.

Производство антител.

С использованием стандартных методов молекулярной биологии лидерные последовательности человеческой тяжелой и легкой цепей (для секреции) добавляли против хода транскрипции относительно указанных выше последовательностей вариабельных областей и затем их присоединяли против хода транскрипции к константной области тяжелой и легкой каппа-цепи человеческого IgG1 соответственно. Полученные полные последовательности ДНК тяжелой и легкой цепей антитела субклонировали в экспрессионных векторах млекопитающих (один для легкой цепи и один для тяжелой цепи) под контролем MPSV-промотора и против хода транскрипции относительно синтетического polyA-сайта, при этом каждый вектор нес последовательность OriP EBV, как описано выше в примере 1. Антитела получали согласно методу, описанному выше в примере 1, а именно осуществляли котрансфекцию клеток HEK293-EBNA с использованием экспрессионных векторов для тяжелой и легкой цепей антитела млекопитающего, собирали кондиционированную среду для культивирования через 5-7 дней после трансфекции и очи-

щали секретированные антитела с помощью аффинной хроматографии на протеине A, катионообменной хроматографии и гель-фильтрации на конечной стадии с выделением чистого мономерного антитела в виде IgG1. Антитела помещали в среду, содержащую 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ раствор глицина, pH 6,7. Варианты гуманизированных антител со сконструированной схемой гликозилирования получали путем котрансфекции с использованием экспрессионных векторов для антител в сочетании с экспрессионными векторами для гликозилтрансферазы GnT-III или с GnT-III-экспрессионным вектором и экспрессионным вектором для маннозидазы II комплекса Гольджи, как это описано выше в примере 1 для химерного антитела. Антитела со сконструированной схемой гликозилирования очищали и приготавливали для дальнейшего анализа согласно описанному выше методу создания антител, не имеющих сконструированную схему гликозилирования. Олигосахариды, присоединенные к Fc-области антитела, анализировали с помощью MALDI/TOF-МС согласно описанному ниже методу.

#### Анализ олигосахаридов.

Метод высвобождения олигосахаридов для антител, находящихся в растворе 40-50 мкг антитела, смешивали с 2,5 мг PNG-азы-F (фирма Glyko, США) в 2 мМ Трис, pH 7,0 в конечном объеме 25 мкл и смесь инкубировали в течение 3 ч при 37°C.

#### Приготовление образцов для MALDI/TOF-МС.

Продукты, полученные в результате ферментативного расщепления, которые содержали высвобожденные олигосахариды, инкубировали еще в течение 3 ч при комнатной температуре после добавления уксусной кислоты до конечной концентрации 150 мМ и затем пропускали через 0,6 мл катионообменной смолы (смола AG50W-X8, гидрированная форма, 100-200 меш, фирма BioRad, Швейцария), которой заполняли микро-био-спиновую хроматографическую колонку (фирма BioRad, Швейцария), для удаления катионов и белков. 1 мкл полученного образца наносили на пластины-мишень из нержавеющей стали и смешивали на пластине с 1 мкл sDHB-матрицы. sDHB-матрицу получали путем растворения 2 мг 2,5-дигидроксибензойной кислоты и 0,1 мг 5-метоксисалициловой кислоты в 1 мл смеси этанол/10 мМ водный раствор хлорида натрия 1:1 (об./об.). Образцы сушили на воздухе, наносили 0,2 мкл этанола и образцам давали окончательно перекристаллизоваться на воздухе.

#### MALDI/TOF-МС.

Для получения масс-спектров применяли MALDI-TOF-масс-спектрометр типа Voyager Elite (фирма Perspective Biosystems). Прибор работал в линейной конфигурации при ускоряющем напряжении 20 кВ и с временем задержки 80 нс. Для определения массы ионов применяли внешнюю калибровку с использованием олигосахаридных стандартов. Для получения окончательного спектра суммировали спектры, полученные при 200 лазерных импульсах.

#### Анализ связывания с антигеном.

Варианты очищенного мономерного гуманизированного антитела тестировали в отношении связывания с человеческим CD20 на клетках-мишениях В-клеточной лимфомы линии Raji с помощью метода анализа, основанного на использовании проточной цитометрии, согласно процедуре, описанной выше в примере 1 для химерного антитела B-ly1.

Связывание вариантов мономерного IgG1 со сконструированной схемой гликозилирования с NK-клетками и линией клеток CHO, экспрессирующих FcγRIIIA.

Человеческие NK-клетки выделяли из свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), используя для обогащения отрицательную селекцию CD16- и CD56-позитивных клеток (система MACS, фирма Miltenyi Biotec GmbH, Бергис Гладбах, Германия). Чистота, которую оценивали по экспрессии CD56, составляла 88-95%. Свежевыделенные NK-клетки инкубировали в ЗФР без ионов кальция и магния (3×10 клеток/мл) в течение 20 мин при 37°C для удаления связанного с NK-клетками IgG. Клетки инкубировали до концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл в присутствии различных концентраций антитела к CD20 (0, 0,1, 0,3, 1,3, 10 мкг/мл) в ЗФР, 0,1% БСА. После нескольких отмывок связывание антитела оценивали путем инкубации с коньюгированным (1:200) с FITCF(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козы антитела, специфическим в отношении F(ab')<sub>2</sub> человеческого IgG (фирма Jackson ImmunoResearch, Вест Гроу, шт. Пенсильвания, США) и античеловеческим CD56-PE (фирма BD Biosciences, Алшвил, Швейцария). Добавляли F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антитела к FcγRIIIA 3G8 (фирма Ancell, Байпорт, шт. Миннесота, США) в концентрации 10 мкг/мл для конкурентного связывания гликозилированных вариантов антитела (3 мкг/мл). Интенсивность флуоресценции, характеризующую варианты связанного антитела, определяли для CD56-позитивных клеток с помощью устройства FACSCalibur (фирма BD Biosciences, Алшвил, Швейцария). CHO-клетки трансфектировали путем электропорации (280 В, 950 мкФ, 0,4 см) экспрессионным вектором, кодирующим α-цепь и γ-цепь FcγRIIIA-Val158. Отбор трансфектантов проводили путем добавления 6 мкг/мл пуромицина на 10 клеток и стабильные клонны анализировали с помощью FACS с использованием 10 мкл коньюгированного с FITC моноклонального антитела к FcgammaRIII 3G8 (фирма BD Biosciences, Алшвил, Швейцария). Связывание IgG1 с экспрессирующими FcgammaRIIIA-Val158 CHO-клетками осуществляли аналогично описанному выше связыванию с NK-клетками.

### Анализ ADCC.

В качестве эффекторных клеток использовали человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), которые получали с помощью Histopaque-1077 (фирма Sigma Diagnostics Inc., Сент-Луис, шт. Миссури, 63178, США) в основном согласно инструкциям производителя. В целом метод состоял в следующем. У добровольцев брали с помощью гепаринизированных шприцев образцы венозной крови. Кровь разбавляли в соотношении 1:0,75-1,3 ЗФР (не содержащим Ca++ или Mg++) и насыщали на Histopaque-1077. Осуществляли центрифугирование в градиенте плотности при 400×g в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) без перерывов. Промежуточную фазу, содержащую PBMC, объемлюли и промывали ЗФР (50 мл на клетки, полученные после двух стадий центрифугирования в градиенте плотности) и собирали центрифугированием при 300×g в течение 10 мин при КТ. После ресуспенсирования дебриса с помощью ЗФР подсчитывали количество PBMC и промывали второй раз путем центрифугирования при 200×g в течение 10 мин при КТ. Затем клетки ресуспенсировали в соответствующей среде для проведения дальнейших процедур.

Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней, которое использовали для ADCC-анализов, составляло 25:1 и 10:1 для PBMC и NK-клеток соответственно. Эффекторные клетки приготавливали в среде AIM-V в соответствующей концентрации и вносили по 50 мкл на лунку в круглодонные 96-луночные планшеты. Клетки-мишени представляли собой клетки человеческой В-лимфомы (например, клетки линии Raji), выращенные в среде DMEM, содержащей 10% ФТС. Клетки-мишени промывали ЗФР, подсчитывали и ресуспенсировали в среде AIM-V до концентрации 0,3 миллиона/мл из расчета 30000 клеток на 100 мкл. Антитела разбавляли AIM-V, добавляли 50 мкл к предварительно высеянным клеткам-мишениям и давали связываться с мишениями в течение 10 мин при КТ. Затем добавляли эффекторные клетки и планшет инкубировали в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Гибель клеток-мишеней оценивали путем измерения высвобождения лактатгидрогеназы (ЛДГ) из поврежденных клеток с использованием набора для определения цитотоксичности (фирма Roche Diagnostics, Роткрайц, Швейцария). После инкубации в течение 4 ч планшеты центрифугировали при 800×g. 100 мкл супернатанта из каждой лунки переносили в новый прозрачный плоскодонный 96-луночный планшет. В каждую лунку добавляли по 100 мкл цветного субстратного буфера из набора. Величины V<sub>max</sub> цветной реакции определяли с помощью ридера для ELISA при длине волн 490 нм в течение по меньшей мере 10 мин с использованием пакета программ SOFTmax PRO (фирма Molecular Devices, Саннивейл, шт. Калифорния, 94089, США). Спонтанное высвобождение ЛДГ оценивали в лунках, содержащих только клетки-мишени и эффекторные клетки, но не содержащих антитела. Максимальное высвобождение определяли в лунках, содержащих только клетки-мишени и 1% Triton X-100. Процент специфической опосредуемой антителом гибели рассчитывали по следующей формуле: ((x - SR)/(MR - SR)·100, где x обозначает среднее значение V<sub>max</sub> при конкретной концентрации антитела, SR обозначает среднее значение V<sub>max</sub> при спонтанном высвобождении и MR обозначает среднее значение V<sub>max</sub> при максимальном высвобождении.

### Анализ комплементзависимой цитотоксичности.

Клетки-мишени подсчитывали, промывали ЗФР, ресуспенсировали в среде AIM-V (фирма Invitrogen) до концентрации 1 млн клеток/мл. Высевали по 50 мкл клеток на лунку в плоскодонный 96-луночный планшет. Приготавливали разведения антитела в AIM-V и по 50 мкл добавляли к клеткам. Антителам давали связываться с клетками в течение 10 мин при комнатной температуре. Свежеоттаянный комплемент человеческой сыворотки (фирма Quidel) разбавляли тремя объемами AIM-V и вносили по 50 мкл в лунки. Кроличий комплемент (фирма Cedarlane Laboratories) приготавливали согласно инструкциям производителя, разбавляли тремя объемами AIM-V и вносили по 50 мкл в лунки. Для контроля перед внесением в среду для анализа источники комплемента выдерживали в течение 30 мин при 56°C.

Планшеты для анализа инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Уничтожение клеток оценивали путем измерения высвобождения ЛДГ. В целом метод заключался в следующем. Планшеты центрифугировали при 300×g в течение 3 мин. Переносили по 50 мкл супернатанта на лунку в новый 96-луночный планшет и добавляли по 50 мкл реагента для анализа из набора для определения цитотоксичности (фирма Roche). Путем измерения кинетических характеристик с помощью ридера для ELISA определяли величину V<sub>max</sub> для соответствующей концентрации ЛДГ в супернатанте. Максимальное высвобождение определяли путем инкубирования клеток в присутствии 1% Triton X-100.

### Анализ В-клеточного истощения цельной крови.

Стандартное В-клеточное истощение цельной крови, вызванное антителами к CD20, осуществляли согласно методу, описанному выше в примере 1.

### Анализ апоптоза.

Способность антител вызывать апоптоз анализировали путем инкубации в течение ночи (16-24 ч) антитела в концентрации 10 мкг/мл (насыщающие условия для связывания с антигеном) с клетками-мишениями (при концентрации клеток-мишеней  $5 \times 10^5$  клеток/мл). Образцы окрашивали AnnV-FITC и анализировали с помощью FACS. Анализ проводили в трех повторностях.

Обнаружение проводили с помощью проточной цитометрии путем выявления апоптозных марке-

ров, таких как аннексии V и фосфатидилсерин. Образцы для отрицательного контроля (без индукции апоптоза) не содержали никаких антител, а содержали только забуференный фосфатом физиологический раствор. Образцы для положительного контроля (максимальный апоптоз) содержали 5 мкМ сильного индуктора апоптоза камфотецина (СРТ).

#### Результаты и обсуждение.

Сравнение связывания с человеческим антигеном CD20 вариантов антитела B-HN1, B-HN2, B-HN3 либо в комплексе с легкой цепью химерного антитела B-ly1 (mVL, полученного согласно методу, описанному в примере 1), либо с легкой цепью гуманизированного B-ly1 (KV1), и родительского химерного антитела chB-ly1 (описанного выше в примере) позволило установить, что все антитела имели близкие значения EC50, но конструкция B-HN1 связывалась с меньшей интенсивностью/стехиометрией, чем варианты B-HN2 и B-HN3 (фиг. 11). B-HN1 отличался от B-HN2 и B-HN3 своими частично гуманизированными участками CDR1 и CDR2 (определение Кэбота), а также наличием полиморфизма Ala/Thr в положении 28 (нумерация согласно Кэботу). Это свидетельствует о том, что как положение 28, так полный CDR1 и/или полный CDR2 являются важными для взаимодействия антитело/антителу.

Сравнение B-HL1, B-HN1 и химерного родительского антитела chB-ly1 позволило установить, что у конструкции B-HL1 отсутствовала какая-либо связывающая активность, а интенсивность связывания/стехиометрия B-HN1 была примерно в два раза меньше, чем у B-ly1 (фиг. 12). Как B-HL1, так и B-HN1 были сконструированы на основе акцепторных каркасных участков, выведенных из человеческих вариабельных областей VH1-класса. Среди других различий наиболее важным является различие в положении 71 (нумерация согласно Кэботу; положение 71 по Кэботу соответствует положению 72 SEQ ID NO:48) конструкции B-HL1, что указывает на его возможную важную роль в связывании с антигеном.

Из сравнения представленных на фиг. 9-13 данных о связывании с антигеном видно, что варианты BHN2-KV1, BHL8-KV1 и BHL11-KV1 обладали наиболее высокой аффинностью к связыванию с человеческим CD20 на поверхности человеческих клеток среди различных тестированных вариантов гуманизированного антитела. Различия между B-HN2, с одной стороны, и B-HL8 и B-HL11, с другой стороны, присутствуют только в FR1- и FR2-участках, причем все три CDR являются идентичными (что видно, например, из сравнения SEQ ID NO: 32, 56 и 60, которые не пронумерованы согласно Кэботу, но для которых обычный специалист в данной области легко может установить нумерацию согласно Кэботу). Для B-HL8 и B-HL11 последовательности FR1 и FR2 выводили из последовательностей человеческой вариабельной области VH3-класса, в то время как полный каркасный участок B-HN2 выводили из человеческой VH1. B-HL11 представляет собой производное B-HL8, несущее одиночную мутацию Glu1Gln (положение 1 является одинаковым как в нумерации согласно Кэботу, так и в стандартной системе нумерации, использованной в перечне последовательностей), при этом в конструкции B-HN2 аминокислотный остаток представляет собой Gln. Это означает, что замена Glu1Gln не изменяет ни аффинность, ни интенсивность связывания. Другие различия между B-HN2 и B-HL8 касаются 14 остатков каркасного участка, из которых один или несколько могут оказывать влияние на способность этого антитела связываться с антигеном.

Конструкцию B-HL4 получали из антитела B-HN2 путем замены FR1 B-HN2 участком последовательности VH1\_45 человеческой зародышевой линии. Эта конструкция обладает существенно более низкой способностью к связыванию с антигеном несмотря на то, что аминокислотные различия присутствуют только в трех положениях в FR1. Эти остатки находятся в положениях 2, 14 и 30 (нумерация согласно Кэботу). Среди них положение 30 может являться положением, оказывающим влияние, поскольку оно является частью CDR1 согласно определению Хотиа. Общий анализ всех представленных на фиг. 9-13 кривых, характеризующих связывание, показывает, что для связывания с CD20 важны следующие остатки тяжелой цепи гуманизированного B-ly1 (нумерация согласно Кэботу): N35 (конец CDR1 согласно Кэботу), полный CDR1 согласно Кэботу, полный CDR2 согласно Кэботу и полный CDR3 согласно Кэботу, остатки A71 и R94 (в этом случае остаток R94 не может быть заменен на треонин) и Y27. A28 и S30 также могут оказывать влияние, но в меньшей степени. Кроме того, для связывания с антигеном важны CDR3 согласно Кэботу и все канонические остатки. В гуманизированную легкую цепь, в которую трансплантировали полные CDR1-, CDR2- и CDR3-участки (согласно Кэботу), не интродуцировали никаких обратных мутаций. В отношении индукции апоптоза (фиг. 14, 15 и 21) наиболее эффективным вариантом оказался гуманизированный вариант B-ly1 BHN2-KV1 (даже более эффективным, чем исходное chB-ly1 и намного более эффективным, чем антитело, имеющее последовательность, идентичную последовательности ритуксимаба, C2B8). Другими гуманизированными вариантами (производными BHL8), которые могли вызывать усиленный апоптоз, оказались: B-HL12 - B-HL17 (см. таблицу) и BHN8 (смешанные каркасные участки) и BHN9 ("смешанные каркасные участки" с одной обратной мутацией, S30T). Положения 9 и 48 (нумерация согласно Кэботу) могут контактировать с антигеном. Варианты BHN4-BHN7 представляют собой другие гуманизированные варианты B-ly1, которые не несут дополнительных отличных от человеческих последовательностей.

Важные свойства гуманизированного антитела B-ly1 обусловлены тем, что оно представляет собой антитело типа II к CD20 согласно определению, которое дано у Cragg M.S. и Glennie M.J., Blood 103(7), апрель 2004 г., с. 2738-2743. Вследствие этого при связывании с CD20 оно не индуцирует какой-либо

устойчивости к экстракции неионными детергентами CD20 с поверхности человеческих CD20+-клеток при анализе с использованием предназначенного для этой цели метода, который описан у Polyak M.J. и Deans J.P., Blood 99(9), 2002, с. 3256-3262. Оно действительно индуцирует существенно меньшую устойчивость к экстракции неионными детергентами CD20, чем антитело C2B8 (другое антитело к CD20, имеющее последовательность, идентичную с последовательностью ритуксимаба (см. публикацию патента США № 2003 0003097 на имя Reff). Как следует ожидать для антитела типа II к CD20, гуманизированное B-ly1 не обладает какой-либо значительной опосредуемой комплементом литической активностью и конечно меньшей опосредуемой комплементом литической активностью, чем антитело KCD20 C2B8 (химерный IgG1, имеющий последовательность, идентичную последовательности ритуксимаба). Другой важной особенностью гуманизированного антитела B-ly1 является то, что оно обладает очень большой активностью в анализе гомотипической агрегации. В этом анализе CD20-позитивные человеческие клетки, клетки Дауди, инкубировали в среде для культуры клеток в течение периода времени вплоть до 24 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в инкубаторе для клеток млекопитающих согласно подробно описанному методу (см. Deans) с антителом в концентрации 1 мкг/мл и параллельно в концентрации 5 мкг/мл. Для сравнения параллельно проводили контрольную инкубацию клеток в идентичных условиях, но с использованием антитела к CD20 C2B8. В различные моменты времени, в том числе после инкубации в течение 8 и 24 ч клетки визуально обследовали с помощью микроскопа. Было установлено, что гуманизированное антитело B-ly1 приводит к сильной гомотипической агрегации, причем агрегаты были существенно крупнее, чем те, которые индуцировались при добавлении контрольного антитела C2B8. Кроме того, в соответствии с тем, что антитело является антителом типа II к CD20, оно индуцировало более высокие уровни апоптоза, когда CD20-позитивные человеческие клетки инкубировали с гуманизированным антителом B-ly1, по сравнению с контрольным опытом, проводимым в идентичных условиях с использованием химерного антитела в виде IgG1, C2B8, имеющего последовательность, идентичную последовательности ритуксимаба.

Варианты гуманизированного антитела со сконструированной схемой гликозилирования получали в клетках млекопитающих путем коэкспрессии гликозилтрансферазы GnTIII совместно с генами антител. Это приводило к увеличению фракции нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к Fc-области антител, включая бисекционные нефукозилированные олигосахариды, как это описано в WO 2004/065540 (фиг. 17-19). Антитела со сконструированной схемой гликозилирования обладают существенно большими уровнями связывания с человеческими Fc $\gamma$ RIII-рецепторами (фиг. 20), а также большей ADCC-активностью (фиг. 16) по сравнению с антителом с несконструированной схемой гликозилирования и по сравнению с антителом C2B8. Гуманизированное антитело B-ly1 оказалось также более эффективным в отношении индукции истощения человеческих B-клеток при анализе цельной крови (фиг. 16), чем контрольное антитело C2B8. Это имело место как для антитела B-ly1 с несконструированной схемой гликозилирования, так и для его версии со сконструированной схемой гликозилирования. Антитело со сконструированной схемой гликозилирования оказалось примерно в 1000 раз более эффективным в отношении B-клеточного истощения при анализе цельной крови, чем контрольное антитело к CD20 C2B8. Это сравнение имеет большое значение для гуманизированных форм антитела B-ly1 как с несконструированной схемой гликозилирования, так и со сконструированной схемой гликозилирования, поскольку в анализах, объединяющих оценку зависящих от Fc-рецептора видов активности, таких как ADCC, опосредуемого комплементом лизиса и индукции апоптоза установлено, что обе формы B-ly1 существенно более эффективны, чем C2B8, хотя обе формы B-ly1 обладают существенно более низкой опосредуемой комплементом литической активностью. Такая более высокая активность гуманизированных вариантов антитела B-ly1 включает ADCC, Fc-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность и индукцию апоптоза. Кроме того, в анализе апоптоза формы этого антитела типа II к CD20 как со сконструированной схемой гликозилирования, так и с несконструированной схемой гликозилирования, оказались более эффективными, причем варианты со сконструированной Fc-областью, обладающие повышенной аффинностью к связыванию с Fc $\gamma$ -рецепторами, оказались даже более эффективными в отношении индукции апоптоза, чем вариант с несконструированной Fc-областью, и все варианты имели более высокую эффективность, чем контрольное антитело C2B8. Точный механизм повышенной гомотипической агрегации и индукции апоптоза, опосредуемый антителом типа II к CD20 не изучен и на это важное свойство может оказывать влияние сопутствующее связывание с другими молекулами на поверхности CD20-позитивных клеток, таких как Fc $\gamma$ -рецепторы. Поэтому важно продемонстрировать, что антитела типа II к CD20, у которых сконструирована их Fc-область для повышения аффинности к связыванию с Fc $\gamma$ -рецепторами, включая Fc $\gamma$ RIII, и для связанного с этим повышения ADCC-активности, все еще обладают выраженной способностью индуцировать апоптоз, даже превышающей способность антител с несконструированной Fc-областью, и индуцируют гомотипическую агрегацию. Индукция апоптоза важна *in vivo*, поскольку в организме имеются области, в которых могут находиться CD20-позитивные клетки-мишени, но где доступ к Fc $\gamma$ RIII-позитивным клеткам более затруднен, чем в крови, такими областями являются, например, лимфатические узлы. В таких местах индукция апоптоза антителом к CD20 сама по себе может иметь решающее значение для хорошей эффективности терапии человека с использованием антител к

CD20 как при лечении злокачественных гематологических заболеваний, таких как неходжкинские лимфомы и хронический В-клеточный лимфолейкоз, так и для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и волчанка, посредством В-клеточного истощения. Повышенная аффинность к связыванию с FcγRIII и более высокая ADCC гуманизированного антитела типа II к CD20 со сконструированной Fc-областью может иметь очень большое значение для таких методов лечения. Наконец, пониженная или незначительная опосредуемая комплементом литическая активность этого антитела типа II к CD20, включая гуманизированные варианты и варианты со сконструированной Fc-областью, может быть важным, поскольку более высокая активация комплемента антителом к CD20 коррелирует с более сильными нежелательными побочными действиями.

**Перечень последовательностей**

<110> ГликАрт Биотехнологи АГ  
 <120> Антигены связывающие молекулы, обладающие повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и эффекторной функцией  
 <130> 1975.029PC01  
 <160> 78  
 <170> PatentIn версия 3.3  
 <210> 1  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 1  
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu  
 20 25 30  
 Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp  
 35 40 45  
 Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr  
 50 55 60  
 Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly  
 85 90 95  
 Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110  
 <210> 2  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus sp.  
 <400> 2  
 ggacctgaac tggtaagcc tggggcctca gtgaagattt cctgcaaagc ttctggctac 60  
 gcattcaggat actcttggat gaactgggtg aaactgaggc ctggacaggg tcttgagtgg 120  
 attggacgga ttttctgg agatggggat actgactaca atggaaatt caagggcaag 180  
 gccacactga ctgctgacaa atccctcaac acagcctaca tgcaactcac cagcctgacc 240  
 tctgtggact ctgcggctca ttatgtca agaaatgtct ttgtatggta ctggtagtt 300  
 tactggggcc aagggactct ggtcaactgtc tctgca 336  
 <210> 3  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 3  
 Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser  
 1 5 10 15

025962

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu  
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn  
35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr  
50 55 60

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val  
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly  
85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100

<210> 4  
<211> 309  
<212> ДНК  
<213> Mus sp.

<400> 4  
aatccagtc ctcttggAAC atcagcttcc atctcctgca ggtcttagtaa gagtctccta 60  
catagtaatg gcatcaactt tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 120  
ctcctgattt atcagatgtc caaccttgtc tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt 180  
gggtcagaa ctgatttac actgagaatc agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 240  
tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg tacacgttcg gaggggggac caagctggaa 300  
ataaaaacgg 309

<210> 5  
<211> 15  
<212> ДНК  
<213> Mus sp.

<400> 5  
tactcttggA tgaac 15

<210> 6  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Mus sp.

<400> 6  
ggctacgcac tcaGttac 18

<210> 7  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Mus sp.

<400> 7  
ggctacgcac tcaGttac ttggatgaac 30

<210> 8  
<211> 48  
<212> ДНК  
<213> Mus sp.

<400> 8

aggcttagta agagtctcct acatagtaat ggcatcactt atttgtat	48
<210> 9	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Mus sp.	
<400> 9 cagatgtcca accttgc tca a	21
<210> 10	
<211> 27	
<212> ДНК	
<213> Mus sp.	
<400> 10 gctcaaaatc tagaacttcc gtacacg	27
<210> 11	
<211> 1407	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> химерная мышиная-человеческая кДНК	
<400> 11 atgggttggaa gcctcatctt gctttcctt gtgcgtgtt ctacgcgtgt cctgtccgag 60 gtcaagctgc agcagctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc 120 tgcaaagctt ctggctacgc attcaagttac tcttggatga actgggtgaa actgaggcct 180 ggacagggtc ttgagttggat tggacggatt tttcttggag atggggatac tgactacaat 240 gggaaatc aagggcaaggc cacactgact gctgacaaat ccttcaacac agcctacatg 300 caactcacca gcctgaccc tttggactt ctggcttatt tatgtcaag aaatgtctt 360 gatggttact gtttagttt ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagctac 420 accaaggccc catcggtctt ccccttggca ccctcttca agagcaccc tggggccaca 480 gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgggtacgggt gtcgtggaaac 540 tcaggcgccc tgaccagccgg cgtgcacacc ttcccggtg ttctacagtc ctcaggactc 600 tactccctca gcagcggtt gaccgtggcc tccagcagct tgggcacccca gacctacatc 660 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gcccaaatct 720 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcttggg gggaccgtca 780 gtttccctt tccccccaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgagggtc 840 acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaatgg 900 gacggcggtgg aggtgcataa tgccaaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacc 960 taccgtgtgg tcagcgctt caccgttctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac 1020 aagtgcagg tctccaaacaa agccctccca gccccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080 aaaggggcagg cccgagaacc acagggtgtac accctgtccc catccggga tgagctgacc 1140 aagaaccagg tcagcgctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200 gagtggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac 1260 tccgacggct ccttcttccctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320 ggaaacgtct tctcatgttc cgtgtatgtc gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag 1380 agccctcccc tggctccggg taaatga 1407	

<210> 12  
 <211> 720  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> химерная мышиная-человеческая кДНК

<400> 12  
 atggatttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaata gtcgttcagt cataatgtcc 60  
 agaggagaca ttgtgtcac ccaaactaca aatccagtca ctcttggAAC atcagcttcc 120  
 atctcctgca ggtcttagaa gagtctccata catagtaatg gcatcaactt tttgtattgg 180  
 tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctccctgattt atcagatgtc caaccttgc 240  
 tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttac actgagaatc 300  
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg 360  
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgtt cgggtggctgc accatctgtc 420  
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttt aaatctggaa ctgcctctgt tttgtgcctg 480  
 ctgataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa aggtggataa cgccctccaa 540  
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggcacgcac ctacagcctc 600  
 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa 660  
 gtcacccatc agggcctgag ctgcctgc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 13  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> химерный мышиный-человеческий полипептид

<400> 13

Met	Gly	Trp	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Arg
1															
														10	15

Val	Leu	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys
														20	25

Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe
														35	40

Ser	Tyr	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Leu	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
														50	55

Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn
														65	70

Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn
														85	90

Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp	Ser	Ala	Val
														100	105

Tyr	Leu	Cys	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp
														115	120

**025962**

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

Ala Val Leu Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
210 215 220

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gin Tyr Asn Ser Thr  
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
420 425 430

025962

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
450 455 460

Ser Pro Gly Lys  
465

<210> 14  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> химерный мышный-человеческий полипептид  
<400> 14

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

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Thr Asn Pro  
20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser  
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 15

Tyr Ser Trp Met Asn  
1 5

<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 16

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr  
1 5

<210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 17

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn  
1 5 10

<210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 18

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 19

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 20

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 21  
<211> 51  
<212> ДНК  
<213> Mus sp.

<400> 21

cggatttttc ctggagatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg c

<210> 22		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Mus sp.		
<400> 22		
tttcctggag atggggatac tgac		24
<210> 23		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> Mus sp.		
<400> 23		
cggatttttc ctggagatgg ggatactgac		30
<210> 24		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> Mus sp.		
<400> 24		
aatgtcttgc atggttactg gttagttac		30
<210> 25		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 25		
Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys		
1 5 10 15		
Gly		
<210> 26		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 26		
Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp		
1 5		
<210> 27		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 27		
Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp		
1 5 10		
<210> 28		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 28		
Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr		
1 5 10		

<210> 29  
 <211> 357  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 29  
 caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttccggata cacttcagc tattcttggta tgagctgggt gccggcaggcc 120  
 cctggacaag ggctcgagtg gatggacgg atctttcccg gcgatgggta tactgactac 180  
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240  
 atggagctga gcagccctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
 tttgatggtt actggcttgtt tactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 30  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> химерный мышний-человеческий полипептид

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

025962

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 31  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

```
<400> 31
caggtgcaat tggtgtcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctteccggata cgccttcagc tattcttggta tgaactgggt gccggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggta tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagccat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggt actggcttgtt ttactggggc cagggaaaccc tggtcaccgt ctccctca 357
```

<210> 32  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышиный-человеческий полипептид

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser
20								25					30		

025962

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                  105                  110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 33  
<211> 366  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 33  
caggtycaat tggtgcaatc tggcgctgaa gtttggatc cttgggatc ttc agtggatc 60

tcctgcaagg cttccggata cgcccttcage tatttttggta tgaactgggt gggggaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggaa tactgactac 180

aatggaaat tcaaggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgc ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctcagct 360

agcacc 366

<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная



aatgggaaat tcaaggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
 tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 36  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> химерный мышный-человеческий полипептид

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 37  
 <211> 357

<212> ДНК  
<213> искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химерная мышиная-человеческая ДНК

&lt;400&gt; 37

caggtgcaat tggcgcagtc tggcgctgaa gtttggaaagc ctgggagttc agtggaaatgtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgcgttcagc tattcttggg tgagctgggt gggcaggcg 120

cctggacaaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggaa tactgactac 180

aatgggaaat tcaaggggcag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttggatgggtt actggcttgtt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctccctca 357

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химерный мышный-человеческий полипептид

&lt;400&gt; 38

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1															
															15

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser
															20
															25
															30

Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
															35
															40
															45

Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
															50
															55
															60

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
															65
															70
															75
															80

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

**025962**

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 39  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Химерная мышьяно-человеческая ДНК

<400> 39  
caggtgcaat tggcgcagtc tggcgctgaa gtttagaagc ctgggagttc agtgaaggc 60  
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttggaa tcaattgggt gcggcaggcg 120  
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcatggggta tactgactac 180  
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240  
atggagctga gcagccctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 40  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Искусственная

<220>  
<223> химерный мышьяно-человеческий полипептид

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
20 25 30

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

## 025962

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 41  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 41  
caggtgcata tggtgcaagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tatttttggta tctcgtgggt gcggcaggcg 120  
cctggacaag ggctcgagtg gatggacgg atcttcccg gcgtatgggta tactgactac 180  
aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagcctat 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggAACCC tggtaaccgt ctccctca 357

<210> 42  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышеский-человеческий полипептид

**025962**

<400> 42

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 43  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 43  
caggtcaat tggtgcatc tggcgctgaa gtttagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttccggata cacccatacatacagctgga tgaactgggt gccggcaggcc 120  
cctggacaag ggctcgatgt gatgggacgg atcttcccg gcgatgggta tactgactac 180  
aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagcctat 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttcatggtt actggcttgtt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 44  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышный-человеческий полипептид

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 45  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>

025962

<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 45	caggtgcaat tggtgagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgctc agtgaaggtc	60
tcctgcgcaagg ctccggata cacccttcagc tatttttggaa tgaactgggt gccggcaggcc	120	
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gogatgggaa tactgactac	180	
aatggggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagcctat	240	
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc	300	
tttgcgtt actggctgtt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctccatca	357	

<210> 46  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
<223> химерный мышечный-человеческий полипептид

<400> 46

Gin Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser  
                   20                  25                  30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
                  100                 105                 110

**025962**

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 47  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 47  
caggtcaat tggcgcgtc tggcgctgaa gtttggaaagc ctggggcctc agtgggttc 60  
tcctgcagg cttccggata cacccttacc tatttttggg tgcactgggt gcggcaggcc 120  
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcatggggta tactgactac 180  
gcacagaaat tccaaaggaaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caccgtctat 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaaccc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 48  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышиный-человеческий полипептид

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

**025962**

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 49  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> **искусственная**

<220>  
<223> **химерная мышьяно-человеческая ДНК**

<400> 49  
gaggtgcata tggcgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60  
tcctgcagg tgcgcggata cacccacc tattcttgc tgcactgggt gcagcaggcc 120  
cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcatggggta tactgactac 180  
gcagagaaat tccaaaggaa agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240  
atggagctga gcagccctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300  
tttgcgtt actggcttgt ttactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 50  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> **искусственная**

<220>  
<223> **химерный мышьяно-человеческий полипептид**

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

025962

Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Tyr	Ser
20							25					30			

Trp Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Glu Lys Phe  
50 55 60

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
                  100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 51  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

```
<400> 51
gagggtgcaat tggcgcggc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60
tcctgcagg tgcgtccggata caccttcacc tattcttgaa tgaactgggt gcagcaggcc 120
cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatggaaat tcaagggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300
tttgcgttgtt actggcttgtt ttactggggc cagggaaaccc tggtcaccgt ctctctca 357
```

**025962**

<210> 52  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышь-человеческий полипептид

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 53  
<211> 366  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышь-человеческая ДНК

<400> 53  
cagatgcaat tggtgcaagtc tggcgctgaa gttaaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60

**025962**

tcctgcaagg cttccggata cacccacc tatttttggg tgagctgggt gccggcaggcc 120  
cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggg tactgactac 180  
gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagctat 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
tttgatggtt actggcttgt ttactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctcagct 360  
agcacc 366

<210> 54  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная  
  
<220>  
<223> химерный мышный-человеческий полипептид  
  
<400> 54

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

## 025962

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 55  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 55  
gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtcaagc ctggcggtc cctgcggctc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cacattdgc tattcttgg aacttgggt gggcaggct 120  
cctggaaagg gcctcgagt ggtggacgg atcttccccg gcatgggg tactgactac 180  
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240  
atggagctga gcagccctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
tttgatggtt actggcttgtt tactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 56  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышный-человеческий полипептид

<400> 56

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

## 025962

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 57  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 57  
cggaattcgg cccacccgtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60  
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtga gtctggagga ggcttggtca 120  
agcctggcgg gtcctgcgg ctctcctgtg cagcctctgg attcgcattc agctattttt 180  
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa aggcctcga gtgggtgggaa cggatcttc 240  
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggaa aattcaaggg cagagtcaca attaccggc 300  
acaatccac tagcacagcc tatatggac tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360  
tgtattactg tgcaagaaat gtcttgcgt gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420  
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 58  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышний-человеческий полипептид

<400> 58

**025962**

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 59  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 59  
caggtgcagc tggggagtc tggaggaggc ttggtaaagc ctggcggtc cctgcggctc 60  
tcctgtcgac cctctggatt cacattttagc tatttttggc tgaactgggt gggcaggct 120  
cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatggggta tactgactac 180  
aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccaca aatccctatg cacagctat 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
tttgtatgtt actggcttgtt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

**025962**

<210> 60  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышный-человеческий полипептид

<400> 60

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 61  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышная-человеческая ДНК

<400> 61	
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg	60
cagcagccac aggagctac tccgaagtgc agtcgtgga gtctggagca ggcttggtca	120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacatc agctattctt	180
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttc	240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggaa aattcaaggg cagagtcaca attaccggcg	300
acaaatccac tagcacagcc tataatggc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg	360
tgttattactg tgcaagaaat gtcttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa	420
ccctggtcac cgtctccctca gctagcgaat tctcg	456

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; химерный мышный-человеческий полипептид

&lt;400&gt; 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80

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

**025962**

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 63  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышьяно-человеческая ДНК

<400> 63  
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60  
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agtcgtcga gtctggagga ggcgtggta 120  
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattttt 180  
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttc 240  
ccggcgtatgg ggataactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccggcc 300  
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360  
tgttattactg tgcaagaaat gtcttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420  
ccctggtcac cgtctccctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 64  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышьно-человеческий полипептид

<400> 64

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

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

**025962**

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 65  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 65  
cggaattcgg cccacccgtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggcgg 60  
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggtcga gtccggagga ggcttgaaga 120  
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacatgg agctattctt 180  
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggaa cggatcttc 240  
ccggcgtatgg ggatactgac tacaatggaa aattcaaggg cagagtcaca attaccggcg 300  
acaaatccac tagcacagcc tataatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360  
tgttattactg tgcaagaaaat gtcttgcgt gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420  
ccctggteac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 66  
<211> 119

**025962**

<212> PRT  
<213> **искусственная**

<220>  
<223> **химерный мышь-человеческий полипептид**

<400> 66

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 67  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> **искусственная**

<220>  
<223> **химерная мышь-человеческая ДНК**

<400> 67  
cggaattcgg cccacccgtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60  
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

**025962**

agcctggctc ttccctgcgg ctctccctgcg cagcctctgg attcacattt agctattttt 180  
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttcc 240  
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccc 300  
acaaatccac tagcacagcc tataatggc tgacgcgcct gagatctgag gacacggccg 360  
tgttattactg tgcaagaaat gtcttgatg gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420  
ccctggtcac cgtctccctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 68  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышьиной-человеческий полипептид

<400> 68

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 69  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 69  
cggaattcgg cccacccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60  
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtga gtctggagga ggcttggtca 120  
agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgcg cagcctctgg attcacatgg agctattctt 180  
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggaa cggatcttc 240  
ccggcgtatgg ggatactgac tacaatggaa aattcaaggg cagagtacaca attaccggcg 300  
acaaatccac tagcacagcc tataatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360  
tgttattactg tgcaagaat gtcttgcgt gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420  
ccctggtcac cgtctccctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 70  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышиный-человеческий полипептид

<400> 70

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

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

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

**025962**

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 71  
<211> 456  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 71  
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60  
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120  
agcctggcggtgtccctgcgg ctctcctgcgt cagcctctgg attcacattt agctattctt 180  
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttc 240  
ccggcgtatgg ggatactgac tacaatggaa aattcaaggg cagagtcaca attaccggcg 300  
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360  
tgttattactg tgcaagaat gtcttgcgt gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420  
ccctggtcac cgtctctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 72  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>

**025962**

<223> химерный мышный-человеческий полипептид

<400> 72

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 73

<211> 57

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 73

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 74

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

**025962**

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 75  
<211> 345  
<212> ДНК  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерная мышиная-человеческая ДНК

<400> 75  
gatatcgta tgacccagac tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gcccgccagc 60  
attagctgca ggtcttagcaa gagccttttg cacagcaatg gcatcactta tttgtattgg 120  
tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctcctgattt atcaaatgtc caaccttgtc 180  
tctggcgctcc ctgaccgggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
agcaggggtgg aggctgagga tggggagtt tattactgcg ctcagaatct agaacttcct 300  
tacacacctcg gcgaggggac caaggtggag atcaaacgta cggtg 345

<210> 76  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> искусственная

<220>  
<223> химерный мышный-человеческий полипептид

<400> 76

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

```

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50                      55                      60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                      70                      75                      80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85                      90                      95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100                     105                     110

Arg Thr Val
115

<210> 77
<211> 66
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 77
atggacatga gggtcggc tcagctctg ggctcctgc tgctctggc cccaggtgcc      60
agggtgt                                         66

<210> 78
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1           5           10          15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

```

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело типа II к CD20, обладающее повышенной ADCC и повышенной способностью индуцировать апоптоз клеток-мишеней, где указанное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область, определяющую комплементарность (CDRs) B-Ly1 антитела мыши, причем:

- (a) CDR1 тяжелой цепи имеет SEQ ID NO:16;
- (b) CDR2 тяжелой цепи имеет SEQ ID NO:26 и
- (c) CDR3 тяжелой цепи имеет SEQ ID NO:28, а

области рамки считывания (FRs) FR1, FR2 и FR3 вариабельных областей тяжелой цепи указанного антитела являются FR последовательностями человека, которые кодируются последовательностью VH1\_10 зародышевой линии человека, а вариабельная область FR4 тяжелой цепи указанного антитела кодируется последовательностью JH4 зародышевой линии человека, и:

- (d) CDR1 легкой цепи имеет SEQ ID NO:18;
- (e) CDR2 легкой цепи имеет SEQ ID NO:19 и
- (f) CDR3 легкой цепи имеет SEQ ID NO:20, а

FR1, FR2 и FR3 вариабельных областей легкой цепи указанного антитела являются FR последовательностями человека, которые кодируются последовательностью VK\_2\_40 зародышевой линии человека, а вариабельная область FR4 легкой цепи указанного антитела кодируется последовательностью JK4 зародышевой линии человека, где указанное антитело имеет Fc-область с модифицированными олигосахаридами и имеет одну или более аминокислотных замен в вариабельной области тяжелой цепи.

- 2. Антитело по п.1, где указанная Fc-область имеет сниженное количество остатков фукозы в N-

связанном олигосахариде.

3. Гуманизированное антитело типа II к CD20, включающее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, включающую B-Ly1 CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:16; B-Ly1 CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:27 и B-Ly1 CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:28; области рамки считывания (FRs) FR1, FR2 и FR3, которые кодируются последовательностью VH1\_10 зародышевой линии человека, и FR4 тяжелой цепи, которая кодируется последовательностью JH4 зародышевой линии человека;

(ii) вариабельную область легкой цепи, включающую B-Ly1 CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20 соответственно; FR1, FR2 и FR3 легкой цепи, которые кодируются последовательностью VK\_2\_40 зародышевой линии человека, и FR4 легкой цепи, которая кодируется последовательностью JK4 зародышевой линии человека, причем указанное антитело индуцирует высокие уровни апоптоза при инкубации с CD20-позитивными клетками человека по сравнению с контролем в идентичных условиях с использованием C2B8 химерного IgG1 антитела с последовательностью, идентичной ритуксимабу, где указанное антитело имеет одну или более аминокислотных замен в вариабельной области тяжелой цепи.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где указанные одна или более аминокислотных замен в вариабельной области тяжелой цепи включают замену M341.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Способ получения антитела по любому из пп.1-4, включающий:

а) культивирование клетки-хозяина, включающей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий указанное антитело, в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного антитела;

б) выделение антитела.

7. Способ уничтожения CD20-экспрессирующих клеток лимфомы, включающий введение в эти клетки антитела по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5 в количестве, достаточном для уничтожения указанных CD20-экспрессирующих клеток лимфомы.

8. Способ ингибирования роста клеток опухоли человека, включающий введение в указанные клетки антитела по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5 в количестве, достаточном для ингибирования роста указанных клеток опухоли человека.

9. Способ лечения расстройства, которое можно лечить с помощью истощения В-клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

10. Способ по п.9, где расстройство представляет собой злокачественное гематологическое заболевание или аутоиммунное заболевание.

11. Способ по п.10, где злокачественное гематологическое заболевание представляет собой В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому или хроническую В-клеточную лимфоцитарную лейкемию.

12. Способ по п.10, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит или волчанку.

Линкер | Начало SEQ ID NO:1 (аминокислотная последовательность) и SEQ ID NO:2 (нуклеотидная последовательность)

```

1  GAGGTCAAGC TCGAGCACTC T GAGGCTGAA CTGTGAAACG CTGGGGCTC AGTAAAGATT TGTGCGAAAG CTCCTGGCTA CCGATTCAGT TACTCTTGGAA
CTCCAGTTGG AGCTCTCTCG A CTCGGCTTGG GACCGACCTGG GACCGGGAG TCACTCTAA AGAGCTTTC GAAGACCGAT GCGTAACTCA ATGAGAGACCT
E V K L Q Q S G P V K R G A S V K I S C K A S G Y A P V Y S W
>>.....B-Ly1 vh.....>
2  TGAACTGGT GAACTGAAACG CTCGGGGCTA AGTGGGGAGA TACTGAAACG AGTGGGGAT TCAAGGCGAA
ACTTGACCCCA CTTTGACTCC GGACCTGTCG CAGRACTCGA CTAACTCCG TAAAAGGAGC CTCTACCCCT AGTACTGAGT TTACCCCTTA AGTCCCGCTT
H N W V K L R P G Q G L E E W I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G
>.....B-Ly1 vh.....>
201  GGCCACACTG ACTTGCTGACA ATGCTCTCAA CACAGCCTGAC ATGCAACTCA CCAAGCTGAC CTCTGGTGGAC TCTGCGCTCT ATTATATGTC AGGAAAGTC
CCGGTGTGAC TGAAGACTCC ATAGGGAGGTT GTAGGGAGT TGAAGTGAAT GTTCGCGACTG GAGACACCTG AGACGCGAGA TAAATACAGC TTCTTACAG
K A T L T A D K S S N T A Y M Q L S L T S V D S A V Y L C A R N V
>.....B-Ly1 vh.....>
301  TTGGTGTGTT ACTTGCTTGTAT TTACTGGGGC CAAGGGACTC TGTGCTGAACT CTGCTA
AAAATCCAA TGACCAATCA ATAGGCCCCG GTTCCTCTAG ACCATGAACTA GAGACGT
F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S A
>.....B-Ly1 vh.....>

```

Фиг. 1

Линкер | Начало SEQ ID NO:1 (аминокислотная последовательность) и SEQ ID NO:2 (нуклеотидная последовательность)

HpaI | MspI

1 GACATTGGGC TCACCAAAAC TACA AATCCA GTCACTCTTC GAAATCAGC TTCCATCTC TCGAGGTCTA GAAAGAGCTCT CCTACATAGT AAATGGCATCA  
CTGTACACG AGTGGGTCTG ATGT TTAGGT CAGTGAGAC CTTGATGAGC AAGGTAGAGG AGCTCAGAT CATTCTCAGA GGATGTATCA TTACCGTACT  
D I V L T Q T T N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I  
>..... B-Ly1 v.1.....>

BseRI | MseI

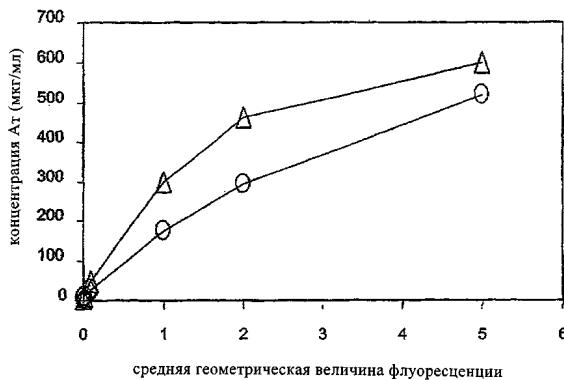
101 CTTATTGTTA TGGTATCTG CAGAAGCCAG GCGAGCTCTC TCACTCTCTG ATTTTACAGA TGTGCAACCT TGTCTCAGAA GTCCCGACAA GGTTCAGTAG  
GAATTAACAT CACATAGAC GTCTCGGTC CGGTCAAGAG AGTCAGAGAC TAAATAGCTC ACAGGTGGA ACAGAGCTCT CAGGGCTCTG CCAAGTCATC  
T Y L Y N Y L Q K P G Q S P Q L I Y Q M S N L V S G V P D R F S  
>..... B-Ly1 v.1.....>

BstI | AfI III

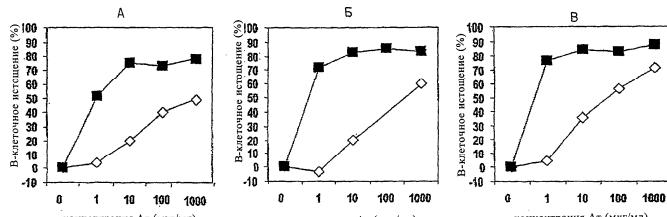
201 CAGTGGGTCA GGAATCTGATT TCACTCTGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATGGG TGTTTATTAC TGNGCTCABA ATCTAGAAGT CCTGTTACAGC  
GTTCAGCAGT CCTTGTACTC AGTGTGACTC TIASTGCTCT CACCTCGAGC TCTTACACCC ACAAATATG ACACAGGTT TAGATCTGAG AGGCATCTGC  
S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L F Y T  
>..... B-Ly1 v.1.....>

301 TTGGAGGGG GAAACAAAGT GGAATTAAGA CGG  
AAGCTTCCC CCTGGTGGH CCTTTATTTT GCC  
F G G G T K L B I K R  
>..... B-Ly1 v.1.....>>

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

SEQ ID NO:11 (нуклеотидная последовательность) и  
SEQ ID NO:13 (аминокислотная последовательность)

SpeI | MluI | PstI

1 ATGGGTTGGA GCTCTATCTT GTCCTCTTGT CTAGGGTGT CCTGTCGAG GTCAAGCTTC AGCTGCTGG ACCTGAACCTG GTGAAGCCG  
TACCGAACTT CGGAGTAGAA CGGAAGGAA CGGGAGAACG GATGGCAACA GGAGAGGAGC CAGTGGAGG TGCTGAGACC TGGAGTGGAC CACTTGGGAC  
M G W S L I L L F L V A V A T R V L S B V K L Q Q S G P E L V K P  
>..... B-Ly1 h.c.....>

HindIII | SstI

101 GGCCCTCACT GAGGATTCG TCGCTAGCTG ATTCAGTTAC TCTTGATGAG ACTGGGGTGA ACTGGGGTGA ACTGGGGTGA ACTGGGGTGA  
CGGGAGCTC CCTCTTAAAGG ACCTTGTGAA GGCGGATCA TAATGAGG AGACAGTACT TGACCCAGT TGACCTGGG CCTTCTCCAG AACCTCCTTA  
G A K V I S C K A G G Y A F S Y V S M M N V K L R F G Q G L E N  
>..... B-Ly1 h.c.....>

201 TGGAGGAGT TTCTCTGGH AGTGGGATAC TGAATCTACAG GGGAAATCA AGGCAAGAGC CACACTGACT GTCAACAAAT CCTCCACAC ACCTCTAC  
ACCTCTAAAG AAGGGCTTC TACCCCTATG AGCTGAGTG CCTTGTGTTG TGTTGAGCTG CGCTCTTTA GGAGGTTG TGAGGTTAC  
I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G K A T L T A D K S S N T A Y M  
>..... B-Ly1 h.c.....>

PstI

301 CAACTCAGCA GCTTGTACCTC TGTGACTCTG CGGGCTATCT TATGTGAGA AAATGCTTCTT GTGGTTACT GTTGTGTTA CTGGGCCAA GGAGCTCTGG  
GTGAGCTGTT CGGAGCTGGAG ACACCTGAGA CGCCGAGATA ATACAGCTTC TTTCAGGAAA CTACCATGTA CCATCATGAT GACCCGGTT CCTGGAGAC  
Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V F D G Y W L V Y R G Q G T L  
>..... B-Ly1 h.c.....>

MspI

401 TCACTGCTC TGCACTTAC ACCAAAGGGG CAGGGCTCTT CGGGCTCTA CGGGCTCTA AGGACACCTC TGGGGCTCA CGGGCTCTA CGGGCTCTA  
AGGAGCTGAG AGCTGAGTC TGTTGCGG CGGGCTCTA CGGGCTCTA CGGGCTCTA CGGGCTCTA CGGGCTCTA CGGGCTCTA CGGGCTCTA  
V T V S A A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A B L G C L  
>..... B-Ly1 h.c.....>

Фиг. 5А

SEQ ID NO:11 (нуклеотидная последовательность) и  
SEQ ID NO:13 (аминокислотная последовательность)

501 CAAGGACTAC TTCCCGGAAC CGGTGACGGT GTGCGGGAA TCAGGGGCCG TGACCGCGG CGTCGACACC TTCCGGCGCT TGCTCAGTCG CTAGGAGTC  
 GTTCTCGCTG AAGGGGCTTG CAGGCTTCA CAGGGACTTC AGTCCGGGGG ACTGTTGTTGGC GAGCGGTTGA AAGGGGCGAC AGGGGGGTTGAG GAGTCGAG  
 V K D Y F P B P V T V S H N S G A L V G H T F P A V L Q S S L  
 >.....B-Ly1 h.c.

601 TACTGCTTCA CGACGCTGTT GACCCGGCCG TCCAGGACGT TGCGGCAACCA GCGCTTCACTG TCGAAAGGTA ATCAGAACCC CGACGACACC AAGGGGACAA  
 AAGGGGAGT CTGGACCA CTGGCGGGG AGGGTCTGCA ACCCGTGGT CGCTGAGTC AGCTGGCTAT TGTGTTGCG GTGTTGTTGG TTCCACCTT  
 Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H H K P S N T K V D  
 >.....B-Ly1 h.c.

AhdI

701 AGRAAGGAGCA GCCCCAAATCT TGTTGACAAA CTCACACATC CCAACGGGTC CGAGCAGCTG AACTCTTGGG UGGCTTCCTCT TCCCCCCTAA  
 TCTTTCGCTT CGGTTTCTAG ACACGTTTTT GAGTGGTGTAC CGGGTGGCGAC CGCTGCTGAGC TTGGAGACCC CGCTGAGCTG CGAGAGGAGGA AAGGGGGTTT  
 K K A E P K S C D E T H T C P P C P A P B E L L G G P S V F L F P P  
 >.....B-Ly1 h.c.

801 ACCGAGGAC ACCTCTATGA TCTTCCGGAC CGCTGGAGTC ACAGTGCGG TGTGGACGT GAGGCCGCAA GACCCGGAG TGAACTGCTA CTGGTAGCTG  
 TGGTTGCTC TGGGGAGT AGAGGGCGCTT CGGGACTCTG TGTAGGACAC CAACTCTGA CGCTGGCTTC CTGGAGCTCC AGCTGGCTTT GCGGACCTT  
 K P K D T L M I S R T P B V C T C V V W D V S H E D P E V U K F V N W Y V  
 >.....B-Ly1 h.c.

901 GAGCGGGTG AGCTGCTATRA TCGCAAGACA AAAGCCCGGG AGGAGGATCA CRACAGAGG TACGGTGTGG TGAGCGCTCT CGCGGCTCTG CGACGAGCT  
 CTGGCGGGAC CGACGCTGTT AGGGTCTCTT TGCGGGCGGC TCTGGTCTCAT GTGGTGTGCTC ATGGCGACCC AGTGGCGAGA CGGGCTCTGA  
 D G V E Y H N A K T C K P R E Q O N S T Y R V V S V Y L T V L H Q D  
 >.....B-Ly1 h.c.

1001 CGGCTGATGAC CGAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCACAACT CGGCTCCCTAT CGGGCTCTG TCGAGGCTCT CGCGGCTCTG CGACGAGCT  
 CGGACTTACG CTGGCTCTAC TACGGTGTG AGGGGTTGGT CGGGGGTAGC TCGTGGTGTG GAGGTTGGC TTGGCGGGCGC CGGGCTCTGA  
 W L N G K B Y K C K V S N K A L P A I E K T I S K A K G Q P R E  
 >.....B-Ly1 h.c.

Фиг. 5Б

SEQ ID NO:11 (нуклеотидная последовательность) и  
SEQ ID NO:13 (аминокислотная последовательность)

SEQ ID NO:12 (нуклеотидная последовательность) и  
SEQ ID NO:14 (аминокислотная последовательность)

SEQ ID NO:14 (диплококклистная последовательность)

1 ATGGATTT AGGTGCAAGT TATCGCTTC GTCATCTCATGATGCG AGAGGAGAGA TTGTGCTCCG CCACTATCA ATACGAGCTCA  
TACCTAAGG TCCAGCTCTA ATATGCGAGG GACGTTAGTG CACGAGCTCA GATTAACAGG TCTGGCTCTGT AACAGAGGTG GTTGTGAGTG TTAGCTGAGT  
M D F Q V Q I F S F L L I S A S V L M S R G D I V L T Q T T H P V  
>.....B-Ly1 l.c.

PstI

-----

PstI

-----

101 CTCTTGAGAC ATGAGCTCC ATCTGCTCA GCGCTTCAAGA GAGCTCTCTA CATACTAGG GCGATCTCA TTGGTATGG TATGCGACAGA AGCCGAGGCCA  
GAGAACCTTG TATGCGAGG TAGAGACGT CGAGATCTT CTGAGAGCTA GATTAACAGG TCTGGCTCTGT AACAGAGGTG GTTGTGAGTG TTAGCTGAGT  
T L G T S A S I S C R S S K S L L H F S N G I T Y Z L Y N C K P G  
>.....B-Ly1 l.c.

201 GTCTGCTCTA CTCTGGATT ATCGAGATTC GCACTCTTC TGAGAGGCG CAGAGCTGGT CAGTGAGCTG CGGTGAGGAGA CTGAGTTCTAC ATCGAGAGTC  
CAGAGAGTC GGGGAACTAA TACTGTACAGA GTTGGACAGC AGTGGCTTCAAG GTCCTTCCAA GTCATCTCATGAGG CCACTATCTG GCTTAACAGT TGAGCTGAGT  
Q S P O D L I Y Z Q M S N L V S G V P D R F E S S S G S G T D F T L R I  
>.....B-Ly1 l.c.

XbaI

-----

BsmI

-----

301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGTTT TATTACTGCT CTCAAACTCT AGGACTTCGG TACAGCTTCG GAGGGGGGAC CAGCTGGAA ATTAAGAGTA  
TGTGCTTCAAC TCCGACTCTC ACACCCACAA ATATAAGCAGC GAGTTTGTAA TCTTGAAAGG AGTGGCAGG CTGCCCCCTG GTTGAGACCTT TATTCTGAC  
S P V E A E D V G V Y Y C A Q N L D E L P Y T F G G G T K L E I K R  
>.....B-Ly1 l.c.

XbaI

-----

BsmI

-----

401 CGGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCACTCTTC CGCCATCTGA TGAGCTGGT AAATCTGGAA CTGGCTCTGT TTGTGCTGCTG CTCATCAACT TCTATCCCG  
GCCACCGGGT TGTGGACAGC AGATGAGAAGG CGGGTACATG ACTGCTGCTAC TTGGACCTGA GAGGCGAGG ACRAAGCGC GNCATTTGA AGATGAGGTC  
T V A A P S V F P P S D B Q L K S G T T A S V V C L L N N F Y P  
>.....B-Ly1 l.c.

XbaI

-----

BsmI

-----

501 AGROGCGCAA GTCAGCTGG AGGTGGAACTA CGCCCTCTCA TGCGGTTAAGG CCGGGAGGTC TTGTGCTGCTG CTCAGAGAGCAGC CTACAGGCC  
TTCTGGCTT CTGCTGACCT TCCACCTTAA CGGGGAGGTG AACGGACCTTA GGTGGCTTCCTC AGCATGCTG GTCAGCTGCTG TGTGCTGCTG GAGGCGCC  
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q B E S V T E Q D S R D S T Y S L  
>.....B-Ly1 l.c.

Фиг. 6А

SEQ ID NO:12 (нуклеотидная последовательность) и  
SEQ ID NO:14 (аминокислотная последовательность)

```

501 AGCAGCACCC TTGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAC ACAAAGCTCA CGCTCTGCCTAA GTCACCCATC AGGGCCGCTGAG CTGGCCGCTGAC ACRRAAGAGCT
TGCTGCTGGG ACTCTGACTTC GTTTCCTCTG ATCTCTCTTG TGTTCCTGAT CGGGAGCTT CAGTCGTTG TGCCGGACTTC GACGGGGGAG TGTTCTCTGAA
S S T D T L S K A D Y B K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S
>.....-B-Ly1 1.c.....>
701 TCAACGAGGG AGAGGTGTTAG
AGTATACCCC TGTACACATC
F N D G B C
P P L I D Q R

```

Фиг. 6Б

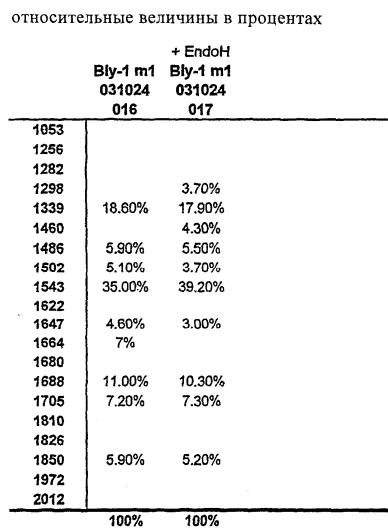
A

CDR1 (Кэбот): TACTCTGGATGAAC TyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 15
CDR1 (Хотия): GGCTACGCATTCACTTACGTTACTCTTGGATGAAC GlyTyrAlaPheSerTyr	SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 16
CDR1 (МАТ): GGCTACGCATTCACTTACGTTACTCTTGGATGAAC GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 17
CDR2 (Кэбот): CGGATTTCCTGGAGATGGGGTACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 25
CDR2 (Хотия): TTTCCTGGAGATGGGGTACTGAC PheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 26
CDR2 (МАТ): CGGATTTCCTGGAGATGGGGTACTGAC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 27
CDR2 (Кэбот, Хотия, АСМ): AATGTCCTTGTGGTACTGGTACTGGTACTGGTAC AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr	SEQ ID NO: 24 SEQ ID NO: 28

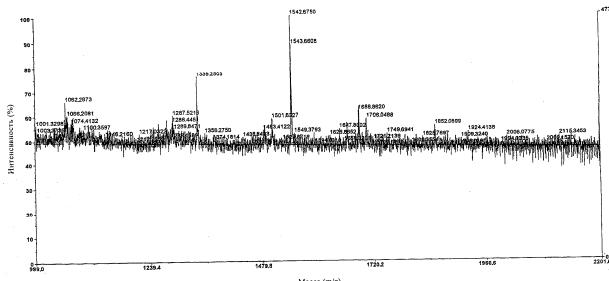
Б

CDR1 (К3бог):	AGGTCTAGTAAAGCTCTACATAGTAATGGCATCACTTATTGTAT	SEQ ID NO: 8
	ArgSerSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr	SEQ ID NO: 18
CDR2 (К3бог):		
CAGATGCCAACCTTGTCTCA		SEQ ID NO: 9
GlnMetSerAsnLeuValSer		SEQ ID NO: 19
CDR3 (К3бог):		
GCTCAAAATAGAACTTCCGTACACG		SEQ ID NO: 10
AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr		SEQ ID NO: 20

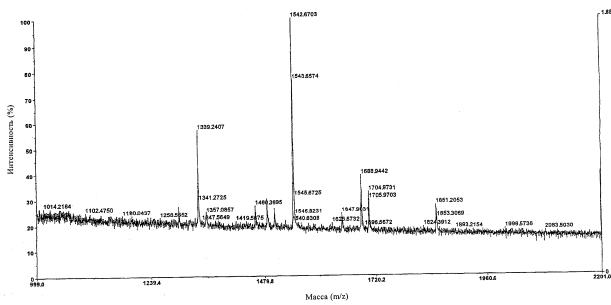
Фиг. 7



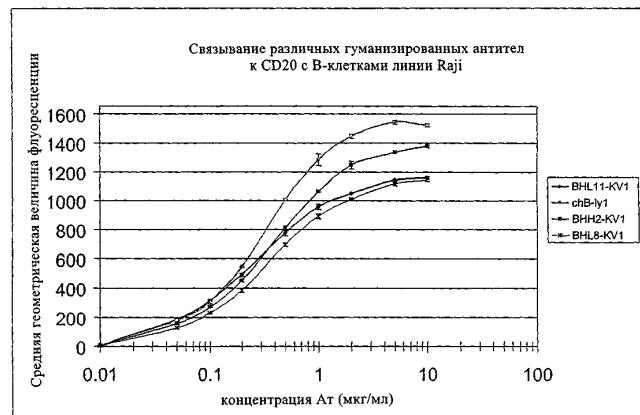
Фиг. 8А



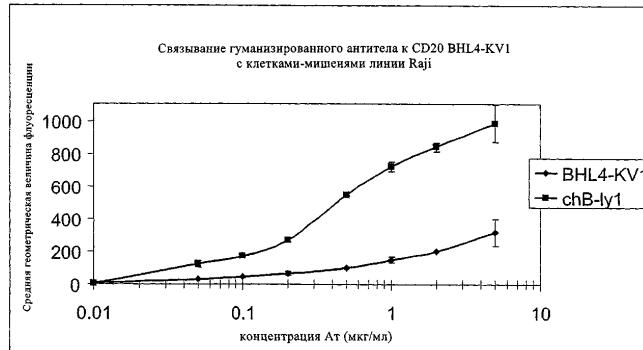
Фиг. 8Б



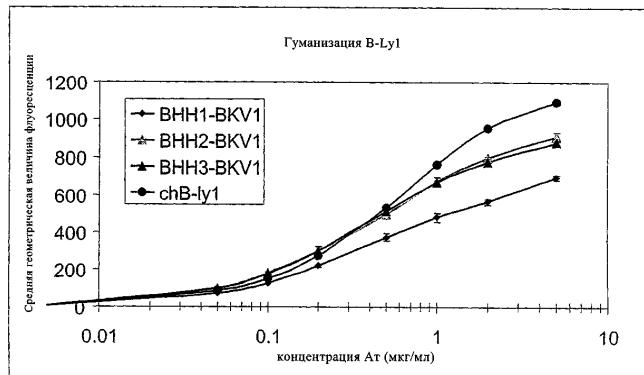
Фиг. 8В



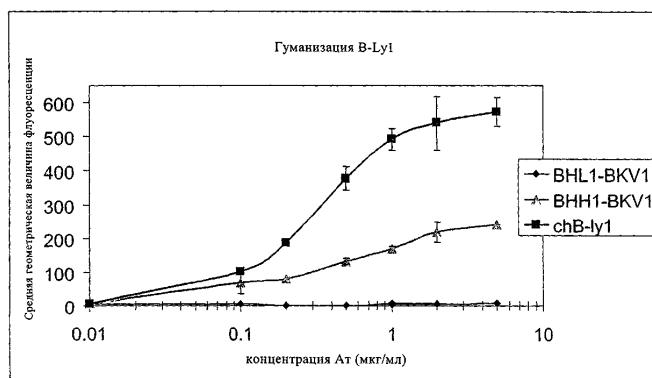
Фиг. 9



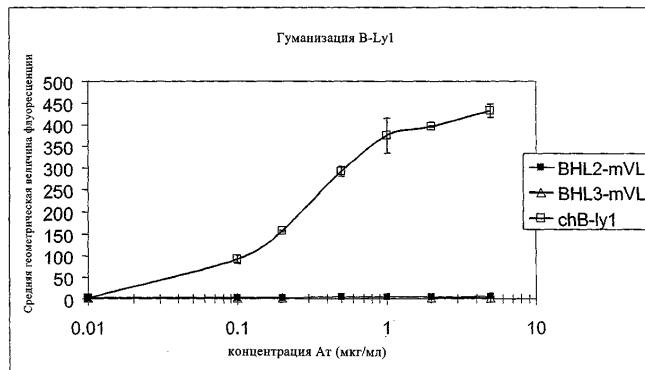
Фиг. 10



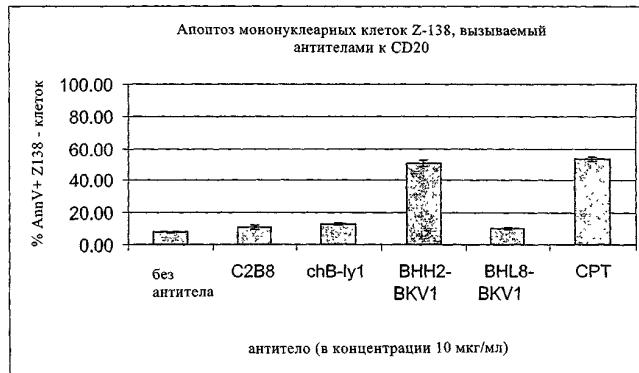
Фиг. 11



Фиг. 12



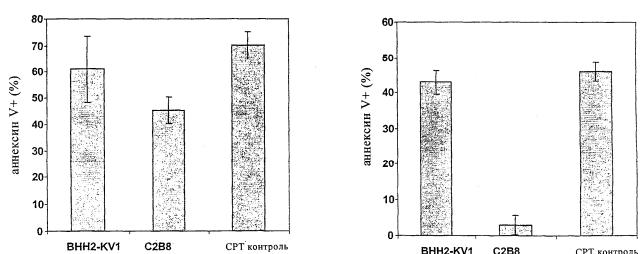
Фиг. 13



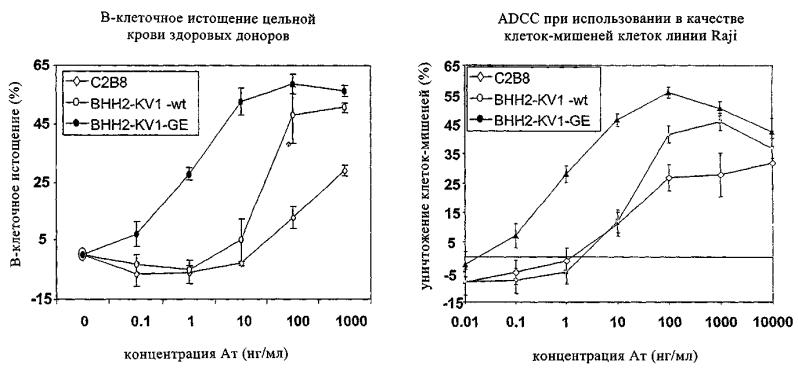
Фиг. 14

PR-1 (линия клеток DLBCL)

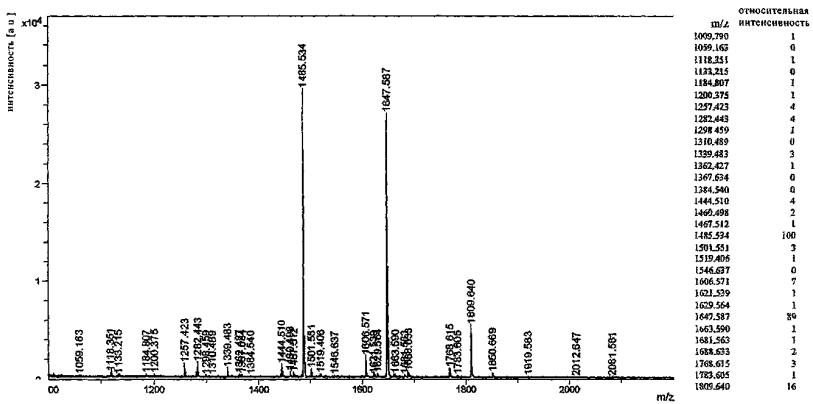
Z-138 (мононуклеарная линия клеток)



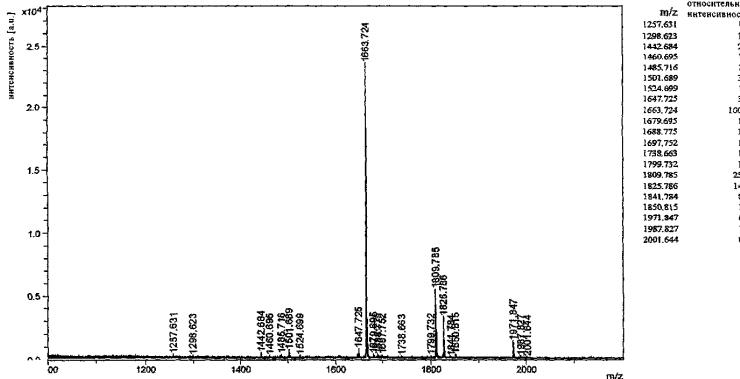
Фиг. 15



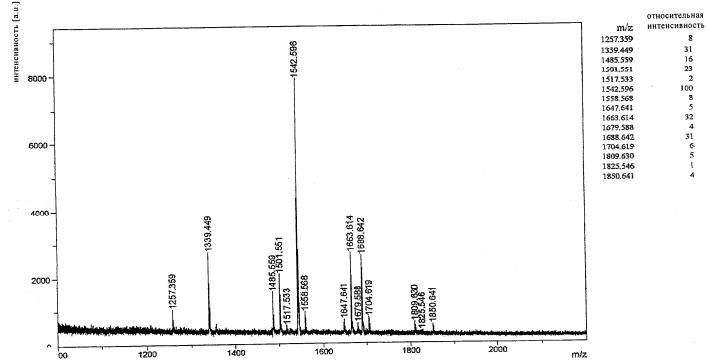
Фиг. 16



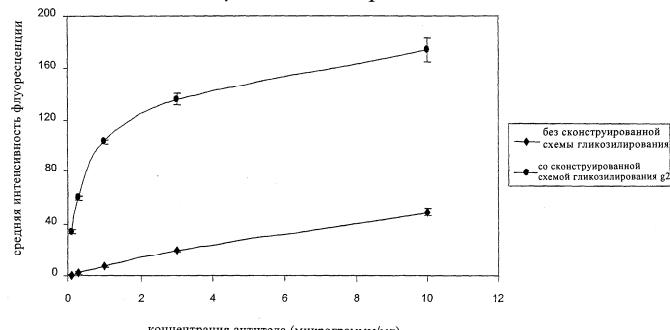
Фиг. 17



Фиг. 18

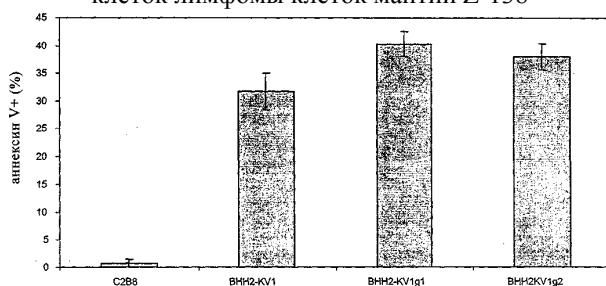


Фиг. 19

Связывание At с Fc<sub>γ</sub>RIII на поверхности CHO-CD16-клеток

Фиг. 20

## Апоптоз, вызываемый антителами к CD20 линии клеток лимфомы клеток мантии Z-138



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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