



(51) МПК
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21)(22) Заявка: 2013137868, 13.01.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.01.2012Дата регистрации:
08.12.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.01.2011 US 61/433,042

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2015 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 10.01.2017 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 14.08.2013(86) Заявка РСТ:
US 2012/021367 (13.01.2012)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/097333 (19.07.2012)Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", Е.В.Воробьевой

(72) Автор(ы):

БАРФИЛД Робин М. (US),
БРЕЙДЕНБАХ Марк Алан (US),
ДЕХАРТ Грегори У. (US),
РАБУКА Дэвид (US)

(73) Патентообладатель(и):

РЕДВУД БАЙОСАЙНС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2008120611 A2, 01.10.2009. US
2008187956 A1, 07.08.2008. US 2009286964 A1,
19.11.2009. RU 2145233 C1, 10.02.2000. US
2010210543 A1, 19.08.2010. EA 0014640 B2,
30.12.2010.C2
C1
C0
C9
C6
C0
C9
RUR
U2
6
0
6
0
1
6C
2(54) МЕЧЕНЫЕ АЛЬДЕГИДОМ ПОЛИПЕПТИДЫ ИММУНОГЛОБУЛИНА И СПОСОБЫ ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Формула изобретения

1. Антитело для получения конъюгата антитела, содержащее полипептид иммуноглобулина Ig, содержащий последовательность аминокислот мотива сульфатазы, при том, что мотив сульфатазы расположен в пределах или вблизи доступного для растворителя участка петли константной области Ig полипептида Ig, где мотив сульфатазы содержит последовательность аминокислот формулы $X_1Z_1X_2Z_2X_3Z_3$, причем

 Z_1 представляет собой цистеин, серин или 2-формилглицин (FGly); Z_2 представляет собой остаток пролина или аланина; Z_3 является алифатической аминокислотой или основной аминокислотой; X_1 присутствует или отсутствует и, если присутствует, может представлять собой

R U
2 6 0 6 0 1 6 C 2

любую аминокислоту;

каждый из X₂ и X₃ независимо представляет собой любую аминокислоту,

где доступный для растворителя участок петли является доступной для растворителя петлей, из:

константной области тяжелой цепи Ig, и соответствует аминокислотам 1-6, 16-22, 42-46, 99-120, 148-156, 208-214 или 220-228 аминокислотной последовательности

константной области тяжелой цепи IgG1, представленной в SEQ ID NO: 2; или

константной области легкой цепи Ig, и соответствует аминокислотам 44-51 аминокислотной последовательности константной области легкой цепи каппа, представленной в SEQ ID NO: 1.

2. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что Z₃ представляет собой аргинин (R).

3. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что каждый из X₁, если он присутствует, X₂ и X₃ независимо представляет собой алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту.

4. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что X₁, если он присутствует, представляет собой L, M, V, S или T.

5. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что каждый из X₂ и X₃ независимо представляет собой S, T, A, V, G или C.

6. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что мотив сульфатазы расположен в пределах или примыкает к доступному для растворителя участку петли константной области тяжелой цепи Ig.

7. Антилого по п. 6, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи Ig представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1.

8. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что мотив сульфатазы расположен в пределах или примыкает к доступному для растворителя участку петли константной области легкой цепи Ig.

9. Антилого по п. 8, отличающееся тем, что константная область легкой цепи Ig представляет собой константную область легкой цепи каппа.

10. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что полипептид Ig содержит два или более мотивов сульфатазы.

11. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что мотив сульфатазы содержит аминокислотную последовательность L(C/S)TPSR.

12. Антилого по п. 11, отличающееся тем, что мотив сульфатазы содержит аминокислотную последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 17).

13. Антилого по п. 1, отличающееся тем, что доступный растворителю участок петли является доступным растворителю участком петли константной области тяжелой цепи IgG1 и имеет аминокислотную последовательность:

ASTKGP (SEQ ID NO: 71);

KSTSGGT (SEQ ID NO: 72);

NSGALTSG (SEQ ID NO: 202);

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 77);

SHEDPEV (SEQ ID NO: 223);

NKALPAP (SEQ ID NO: 84); или

KAKGQPR (SEQ ID NO: 206); или

является доступным растворителю участком петли константной области легкой цепи каппа, и имеет аминокислотную последовательность DNALQSGN (SEQ ID NO: 211).

14. Антилого по п. 13, отличающееся тем, что мотив сульфатазы содержит аминокислотную последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 17),

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли ASTKGP

R U 2 6 0 6 0 1 6 C 2

(SEQ ID NO: 71) модифицирована в ASTKGLCTPSR;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли NSGALTSG (SEQ ID NO: 202) модифицирована в NSGALCTPSRG (SEQ ID NO: 203);

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли EPKSCDKTHTCPPCAPELLGG (SEQ ID NO: 77) модифицирована в EPKSCDKTHTCPPCPLCTPSRELLGG;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли SHEDPEV (SEQ ID NO: 223) модифицирована в SHEDLCTPSREV;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли NKALPAP (SEQ ID NO: 84) модифицирована в NLCTPSRAP;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли KAKGQPR (SEQ ID NO: 206) модифицирована в KAKGLCTPSR (SEQ ID NO: 207); или

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли DNALQSGN (SEQ ID NO: 211) модифицирована в DNALCTPSRQSGN (SEQ ID NO: 219).

15. Антитело по п. 13, отличающееся тем, что антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую:

остаткам 136-469 из SEQ ID NO: 16;

остаткам 136-467 из SEQ ID NO: 19;

остаткам 136-468 из SEQ ID NO: 21;

остаткам 144-476 из SEQ ID NO: 50;

остаткам 136-468 из SEQ ID NO: 26;

остаткам 136-470 из SEQ ID NO: 28;

остаткам 136-467 из SEQ ID NO: 30;

остаткам 144-475 из SEQ ID NO: 54;

остаткам 136-468 из SEQ ID NO: 34; или

остаткам 144-476 из SEQ ID NO: 58; или

константную область легкой цепи каппа, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую:

остаткам 134-245 из SEQ ID NO: 44; или

остаткам 133-244 из SEQ ID NO: 68.

16. FGly-модифицированное антитело, включающее антитело по любому из пунктов 1-15, где мотив сульфатазы в полипептиде иммуноглобулина (Ig) модифицирован формилглицин-образующим ферментом (FGE) таким образом, чтобы содержать остаток 2-формилглицина (FGly), для конъюгирования с ним молекулы.

17. Коньюгат антитела для направленной доставки ковалентно конъюгированной молекулы, который содержит:

FGly-модифицированное антитело по п. 16; и

ковалентно конъюгированную молекулу,

причем FGly ковалентно связан с молекулой.

18. Коньюгат антитела по п. 17, отличающийся тем, что ковалентно присоединенная молекула выбрана из лекарственного средства, детектируемой метки, водорастворимого полимера и синтетического пептида.

19. Коньюгат антитела по п. 17, отличающийся тем, что указанный коньюгат антитела содержит два или более модифицированных мотивов сульфатазы.

20. Коньюгат антитела по п. 18, отличающийся тем, что ковалентно присоединенная молекула представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство.

21. Коньюгат антитела по п. 20, отличающийся тем, что указанное низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой противораковое химиотерапевтическое средство.

**R
U
C
2
6
0
6
0
9
0
6
0
2**

22. Конъюгат антитела по п. 21, отличающийся тем, что указанное противораковое химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующее средство, нитрозомочевину, антиметаболит, противоопухолевый антибиотик, алкалоид барвинка или стероидный гормон.

23. Конъюгат антитела по п. 18, отличающийся тем, что ковалентно присоединенная молекула представляет собой водорастворимый полимер.

24. Конъюгат антитела по п. 23, отличающийся тем, что водорастворимый полимер представляет собой поли(этиленгликоль).

25. Конъюгат антитела по п. 18, отличающийся тем, что ковалентно присоединенная молекула представляет собой детектируемую метку.

26. Конъюгат антитела по п. 25, отличающийся тем, что детектируемая метка представляет собой средство для визуализации.

27. Конъюгат антитела по п. 17, отличающийся тем, что указанный конъюгат антитела содержит молекулу, ковалентно связанную с константной областью тяжелой цепи Ig, и молекулу, ковалентно связанную с константной областью легкой цепи Ig.

28. Конъюгат антитела по п. 17, отличающийся тем, что указанное антитело специфично связывается с опухолевым антигеном на раковой клетке.

29. Конъюгат антитела по п. 28, отличающийся тем, что полипептид Ig через модифицированный FGly-остаток ковалентно присоединен к цитотоксическому средству.

30. Конъюгат антитела по п. 17, отличающийся тем, что указанное антитело специфично связывается с антигеном на клетке, зараженной вирусом.

31 Конъюгат антитела по п. 30, отличающийся тем, что антиген кодируется вирусом.

32. Конъюгат антитела по п. 30, отличающийся тем, что полипептид Ig через модифицированный FGly-остаток ковалентно присоединен к ингибитору слияния вируса.

33. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид иммуноглобулина (Ig) с альдегидным тэгом для получения антитела по п. 1, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид Ig, где полипептид Ig содержит мотив сульфатазы, где мотив сульфатазы расположен в пределах или вблизи доступного для растворителя участка петли константной области полипептида Ig,

где мотив сульфатазы содержит последовательность аминокислот формулы $X_1Z_1X_2Z_2X_3Z_3$, причем

Z_1 представляет собой цистеин или серин;

Z_2 представляет собой остаток пролина или аланина;

Z_3 является алифатической аминокислотой или основной аминокислотой;

X_1 присутствует или отсутствует и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту;

каждый из X_2 и X_3 независимо представляет собой любую аминокислоту,

где доступный для растворителя участок петли является доступной для растворителя петлей, из:

константной области тяжелой цепи Ig, и соответствует аминокислотам 1-6, 16-22, 42-46, 99-120, 148-156, 208-214 или 220-228 аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи IgG1, представленной в SEQ ID NO: 2; или

константной области легкой цепи Ig, и соответствует аминокислотам 44-51 аминокислотной последовательности константной области легкой цепи каппа, представленной в SEQ ID NO: 1.

34. Нуклеиновая кислота по п. 33, отличающаяся тем, что мотив сульфатазы расположен в пределах или вблизи доступного для растворителя участка петли константной области тяжелой цепи Ig.

35. Нуклеиновая кислота по п. 34, отличающаяся тем, что полипептид Ig

R U
2 6 0 6 0 1 6 C 2

дополнительно содержит вариабельную область тяжелой цепи Ig.

36. Нуклеиновая кислота по п. 33, отличающаяся тем, что мотив сульфатазы расположен в пределах или вблизи доступного для растворителя участка петли константной области легкой цепи Ig.

37. Нуклеиновая кислота по п. 33, отличающаяся тем, что полипептид Ig дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи Ig.

38. Нуклеиновая кислота по п. 33, отличающаяся тем, что мотив сульфатазы содержит аминокислотную последовательность L(C/S)TPSR.

39. Нуклеиновая кислота по п. 38, отличающаяся тем, что мотив сульфатазы содержит аминокислотную последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 17).

40. Нуклеиновая кислота по п. 33, отличающаяся тем, что доступный растворителю участок петли:

является доступным растворителю участком петли константной области тяжелой цепи IgG1 и имеет аминокислотную последовательность:

ASTKGP (SEQ ID NO: 71);

KSTSGGT (SEQ ID NO: 72);

NSGALTSG (SEQ ID NO: 202);

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 77);

SHEDPEV (SEQ ID NO: 223);

NKALPAP (SEQ ID NO: 84); или

KAKGQPR (SEQ ID NO: 206); или

является доступным растворителю участком петли константной области легкой цепи каппа и имеет аминокислотную последовательность DNALQSGN (SEQ ID NO: 211).

41. Нуклеиновая кислота по п. 40, отличающаяся тем, что мотив сульфатазы содержит аминокислотную последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 17), и

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли ASTKGP (SEQ ID NO: 71) модифицирована в ASTKGLCTPSR;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли NSGALTSG (SEQ ID NO: 202) модифицирована в NSGALCTPSRG (SEQ ID NO: 203);

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 77) модифицирована в

EPKSCDKTHTCPPCPLCTPSRELLGG;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли SHEDPEV (SEQ ID NO: 223) модифицирована в SHEDLCTPSREV;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли NKALPAP (SEQ ID NO: 84) модифицирована в NLCTPSRAP;

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли KAKGQPR (SEQ ID NO: 206) модифицирована в KAKGLCTPSR (SEQ ID NO: 207); или

где аминокислотная последовательность доступной растворителю петли DNALQSGN (SEQ ID NO: 211) модифицирована в DNALCTPSRQSGN (SEQ ID NO: 219).

42. Нуклеиновая кислота по п. 40, отличающаяся тем, что антитело содержит:

константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую:

остаткам 136-469 из SEQ ID NO: 16;

остаткам 136-467 из SEQ ID NO: 19;

остаткам 136-468 из SEQ ID NO: 21;

остаткам 144-476 из SEQ ID NO: 50;

остаткам 136-468 из SEQ ID NO: 26;

остаткам 136-470 из SEQ ID NO: 28;

остаткам 136-467 из SEQ ID NO: 30;

R
U

2
6
0
6
0
1
6

C
2

остаткам 144-475 из SEQ ID NO: 54;
остаткам 136-468 из SEQ ID NO: 34; или
остаткам 144-476 из SEQ ID NO: 58; или
константную область легкой цепи каппа, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую:
остаткам 134-245 из SEQ ID NO: 44; или
остаткам 133-244 из SEQ ID NO: 68.

43. Рекомбинантный вектор экспрессии для экспрессии полипептида Ig в клетке-хозяине, который содержит нуклеиновую кислоту по п. 33-42, функционально связанную с промотором.

44. Рекомбинантный вектор экспрессии по п. 43, отличающийся тем, что вектор содержит сайт встраивания для вариабельной области Ig в 5' направлении относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид Ig с альдегидным тэгом.

45. Вектор экспрессии по п. 43, отличающийся тем, что клетка-хозяин является клеткой млекопитающего.

46. Библиотека рекомбинантных векторов экспрессии, которая содержит:
популяцию рекомбинантных векторов экспрессии по п. 43, при том, что каждый член популяции содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид иммуноглобулина, который содержит альдегидный тэг отличным от других образом.

47. Библиотека FGly-модифицированных антител, где каждое антитело содержит полипептид иммуноглобулина (Ig) с альдегидным тэгом, которая содержит:

популяцию FGly-модифицированных антител по п. 16, при том, что указанная популяция включает члены, содержащие полипептиды Ig, которые содержат альдегидный тэг отличным от других образом.

48. Фармацевтическая композиция, которая содержит:

- эффективное количество конъюгата антитела по п. 17; и
- фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

49. Композиция по п. 48, отличающаяся тем, что ковалентно присоединенная молекула выбрана из лекарственного средства, детектируемой метки, водорастворимого полимера или синтетического пептида.

50. Композиция по п. 49, отличающаяся тем, что ковалентно присоединенная молекула выбрана из низкомолекулярного лекарственного средства.

51. Композиция по п. 50, отличающаяся тем, что низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой противораковое химиотерапевтическое средство.

52. Композиция по п. 51, отличающаяся тем, что химиотерапевтическое противораковое средство представляет собой алкилирующее средство, нитрозомочевину, антиметаболит, противоопухолевый антибиотик, алкалоид барвинка или стероидный гормон.

53. Композиция по п. 49, отличающаяся тем, что ковалентно присоединенная молекула представляет собой водорастворимый полимер.

54. Композиция по п. 53, отличающаяся тем, что водорастворимый полимер представляет собой поли(этиленгликоль).

55. Композиция по п. 49, отличающаяся тем, что ковалентно присоединенная молекула представляет собой детектируемую метку.

56. Композиция по п. 55, отличающаяся тем, что детектируемая метка представляет собой средство для визуализации.

57. Способ получения конъюгата антитела, который включает этапы:
проведение реакции FGly-модифицированного антитела по п. 16 с реакционно-способным партнером, содержащим группу, реагирующую с альдегидом, и молекулой, для образования продукта реакции, содержащего молекулу, ковалентно

конъюгированную с FGly-модифицированным полипептидом Ig, через модифицированный остаток FGly.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что молекула представляет собой лекарственное средство, детектируемую метку, водорастворимый полимер или синтетический пептид.

59. Способ по п. 57, отличающийся тем, что группа, реагирующая с альдегидом, представляет собой аминоокси или гидразид реакционно-способную группу.

60. Способ направленной доставки лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом, включающий введение указанному индивидууму эффективного количества конъюгата антитела по п. 17, где присоединенная молекула является лекарственным средством и где конъюгат антитела специфически связывается с антигеном, присутствующим на поверхности клетки.