



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 488 597** (13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2007133439/10, 07.02.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.02.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.02.2005 US 60/650,115

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2009 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 27.07.2013 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 1995/020045 A1, 27.07.1995. WO 2002/030984 A, 18.04.2002. WO 2005/056759 A, 23.06.2005. CUNNINGHAM M.P. et al. "Responses of Human Colorectal Tumor Cells to Treatment with the Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody ICR62 Used Alone and in Combination with the EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib", J. Cancer Res. (2006), (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 07.09.2007

(86) Заявка РСТ:
IB 2006/000238 (07.02.2006)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/082515 (10.08.2006)

Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр.1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

УМАНА Пабло (СН),
МОССНЕР Эккехардт (СН)

(73) Патентообладатель(и):

ГЛИКАРТ БИОТЕХНОЛОГИ АГ (СН)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ EGFR, КОДИРУЮЩИЕ ИХ ВЕКТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и иммунологии. Предложены выделенные полинуклеотиды и полипептиды для связывания человеческого EGFR в составе антитела, вектор и клетка-хозяин для экспрессии антитела, способ получения анти-EGFR антитела или фрагмента антитела, анти-EGFR антитело и фрагмент антитела. Рассмотрены композиция,

содержащая анти-EGFR антитело или его фрагмент, ее применение, а также применение антитела и его фрагмента для лечения расстройств, ассоциированных с EGFR. Кроме того, описан способ детекции присутствия EGFR в образце с помощью антитела по изобретению. Настоящее изобретение относится к гуманизированным вариантам антитела крысы ICR62 и, таким образом, может найти

дальнейшее применение в терапии EGFR-опосредованных заболеваний. 30 н. и 55 з.п. ф-лы, 29 ил., 38 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

66(15): 7708-7715. MODJTAHEDI H. et al. "Targeting of cells expressing wild-type EGFR and type-III mutant EGFR (EGFRvIII) by anti-EGFR MAb ICR62: A two-pronged attack for tumour therapy". International J. of Cancer (2003), 105(2):273-280. HERBST R.S. et al. "Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors", J. Cancer (2002), 94(5): 1593-1611. MODJTAHEDI И. et al. "Phase I trial and tumour localisation of the anti-RGFR monoclonal antibody ICR62 in head and neck or lung cancer.", Br. J. Cancer. (1996), 73(2); 228-235. ASTSATUROV I. et al. "EGFR-Targeting Monoclonal Antibodies in Head and Neck Cancer", J. Current Cancer Drug Targets (2006), 6(8): реферат. WO 2004/099249 A2, 18.11.2004. RU 2004100834 A, 27.03.2005. RU 2005112742 A, 20.01.2006.

RU 2 4 8 8 5 9 7 C 2

RU 2 4 8 8 5 9 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2007133439/10, 07.02.2006**(24) Effective date for property rights:
07.02.2006

Priority:

(30) Convention priority:
07.02.2005 US 60/650,115(43) Application published: **20.03.2009 Bull. 8**(45) Date of publication: **27.07.2013 Bull. 21**(85) Commencement of national phase: **07.09.2007**(86) PCT application:
IB 2006/000238 (07.02.2006)(87) PCT publication:
WO 2006/082515 (10.08.2006)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str.1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**UMANA Pablo (CH),
MOSSNER Ehhkekhardt (CH)**

(73) Proprietor(s):

GLIKART BIOTEKHNOLOGI AG (CH)(54) **ANTIGEN-BINDING MOLECULES, WHICH BIND EGFR, THEIR CODING VECTORS AND THEIR USAGE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: extracted polynucleotides and polypeptides are proposed to bind a human EGFR within an antibody, a vector and a master cell for expression of an antibody, the method to produce an anti-EGFR of antibody or an antibody fragment, an anti-ERFR antibody and an antibody fragment. A composition is considered, which contains an anti-EGFR antibody or its fragment, its application, and also application of the antibody and its fragment for

treatment of disorders associated with EGFR. Besides, the method is described to detect presence of EGFR in the sample with the help of the antibody according to the invention. This invention relates to humanised versions of the rat antibody ICR62 and thus may find further application in therapy of EGFR-mediated diseases.

EFFECT: improved efficiency of compound application.

85 cl, 5 ex, 29 dwg, 38 tbl

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (АСМ). В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение
5 относится к рекомбинантным моноклональным антителам, включая химерные, приматизированные или гуманизированные антитела, специфические в отношении рецептора человеческого эпидермального фактора роста (EGFR).
10 Кроме того, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим данные АСМ, а также векторам и клеткам-хозяевам, включающим данные молекулы нуклеиновой кислоты. Изобретение далее относится к способам получения АСМ, представленных в изобретении, и к
15 способам применения данных АСМ при лечении заболевания. Кроме того,

настоящее изобретение относится к АСМ с модифицированным гликозилированием, обладающим улучшенными терапевтическими свойствами, включая антитела с повышенным уровнем связывания Fc-рецептора и повышенной эффекторной функцией.

Предшествующий уровень техники

EGFR и антитела к EGFR

Рецептор человеческого эпидермального фактора роста (известный также как HER-1 или Erb-B1 и обозначаемый в данном контексте как "EGFR") представляет собой трансмембранный рецептор 170 кД, кодируемый протоонкогеном c-erbB и проявляющий присущую ему активность тирозинкиназы (см. статьи Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). Элемент базы данных SwissProt P00533 представляет последовательность EGFR. Кроме того, существуют изоформы и варианты EGFR (например, альтернативные транскрипты РНК, укороченные версии, полиморфизмы и т.п.), включая, но без ограничения идентифицированными элементами базы данных Swissprot NoNo P00533-1, P00533-2, P00533-3 и P00533-4. Известно, что EGFR связывает лиганды, в том числе эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), амфирегулин, гепаринсвязывающий EGF (hb-EGF), бетацеллюлин и эпирегулин (см. статьи Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Mendelsohn and Baselga, Oncogene 19:6550-6565 (2000)). EGFR регулирует многочисленные клеточные процессы посредством путей сигнальной трансдукции, опосредуемых тирозинкиназой, включая, но без ограничения перечисленным, активацию путей сигнальной трансдукции, которые контролируют клеточную пролиферацию, дифференцировку, выживаемость клетки, апоптоз, ангиогенез, митогенез и метастазирование (см. статьи Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao and Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

Сверхэкспрессия EGFR описана при многочисленных злокачественных состояниях у человека, включая рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легкого, молочной железы, яичников, толстой кишки, простаты и почки. (см. статьи Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., Br. J. Cancer

73:228-235 (1996)). При многих из данных состояний сверхэкспрессия EGFR коррелирует или ассоциируется с неблагоприятным прогнозом для пациентов. (см. статьи Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). EGFR экспрессируется также в клетках нормальных тканей, особенно эпителиальных тканей кожи, печени и желудочно-кишечного тракта, хотя обычно на более низких уровнях, чем в злокачественных клетках (см. статью Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)).

Неконъюгированные моноклональные антитела (mAb) могут представлять собой эффективные лекарственные средства для лечения рака, как показывает одобрение Управления по контролю над качеством пищевых продуктов и медикаментов США трастуцумаба (Herceptin™; Genentech Inc.), предназначенного для лечения запущенного рака молочной железы (см. статьи Grillo-Lopez, A.-J., et al., Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)), ритаксимаба (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA и Genentech Inc., San Francisco, CA), предназначенного для лечения CD20-положительной В-клеточной, низкодифференцированной или фолликулярной лимфомы не-Ходжкина, гемтуцумаба (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst), предназначенного для лечения рецидивирующего острого миелоидного лейкоза и алемтуцумаба (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG), предназначенного для лечения В-клеточного хронического лимфолейкоза. Успех данных продуктов основан не только на их эффективности, но также на их замечательных профилях безопасности (см. статьи Grillo-Lopez, A.J., et al., Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)). Несмотря на достижения в области данных лекарственных препаратов, в настоящее время существует большой интерес к получению более высокоспецифической активности антител, чем та, которую обычно получают при терапии с использованием неконъюгированных mAb.

Результаты ряда исследований позволяют предположить, что Fc-рецептор-зависимые механизмы вносят вклад в действие цитотоксических антител к опухолям и показывают, что оптимальное антитело к опухолям предпочтительно связывалось бы с активирующими Fc-рецепторами и минимально с ингибирующим партнером FcγRIIB. (см. статьи Clynes, R. A., et al., Nature Medicine 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M. и Ravetch, J. V., J. Exp. Med.

195(12):1653-1659 (июнь 2002). Например, результаты по меньшей мере одного исследования предполагают, что полиморфизм в рецепторе FcγRIIIa, в частности, сильно ассоциирован с эффективностью терапии антителами. (см. статью Cartron, G., et al., Blood 99(3):754-757 (февраль 2002)). Данное исследование показало, что у пациентов, гомозиготных по FcγRIIIa, лучше ответ на ритаксимаб, чем у гетерозиготных пациентов. Авторы заключают, что улучшенный ответ обусловлен улучшенным связыванием *in vivo* антитела к FcγRIIIa, который приводит в результате к повышенной активности ADCC в отношении клеток лимфомы. (см. статью Cartron, G., et al., Blood 99(3):754-757 (февраль 2002)).

Описаны различные стратегии получения направленности на EGFR и блокирования сигнальных путей EGFR. Маленькие молекулы-ингибиторы тирозинкиназы, такие как джефитиниб, эрлотиниб и CI-1033, блокируют аутофосфорилирование EGFR на внутриклеточном участке тирозинкиназы, ингибируя таким образом происходящие далее по ходу процесса события передачи сигнала (см. статью Tsao and Herbst, Signal 4: 4-9 (2003)). Моноклональные антитела, с другой стороны, направлены на внеклеточную часть EGFR, что приводит в результате к блокированию связывания лиганда и, таким образом, ингибирует происходящие далее по ходу процесса события, такие как пролиферация клетки (см. статью Tsao and Herbst, Signal 4: 4-9 (2003)).

Генерирован ряд мышинных моноклональных антител, которые осуществляют блокирование *in vitro*, и которые оценены по их способности воздействовать на рост опухоли на моделях ксенотрансплантатов у мышей (см. статью Masui, et al., Cancer Res. 46:5592-5598 (1986); Masui, et al., Cancer Res. 44:1002-1007 (1984); Goldstein, et al., Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318 (1995)). Например, EMD 55900 (EMD Pharmaceuticals) представляет собой мышинное моноклональное антитело к EGFR, которое образуется в отношении клеточной линии человеческой эпидермоидной карциномы A431 и было протестировано в клинических исследованиях пациентов с запущенной карциномой сквамозных клеток глотки или гипотаринкса (см. статью Bier et al., Eur. Arch. Otolaryngol. 252:433-9 (1995)). Кроме того, показано, что крысиные моноклональные антитела ICR16, ICR62 и ICR80, которые связывают внеклеточный домен EGFR, эффективны в плане ингибирования связывания

рецептора EGF и TGF- α (трансформирующий фактор роста) (см. статью Modjtahedi et al., Int. J. Cancer 75:310-316 (1998)). Мышиное моноклональное антитело 425 представляет собой другое MAb (моноклональное антитело), которое образуется в отношении клеточной линии карциномы человека A431, и обнаружено, что оно связывается с полипептидным эпитопом на наружном домене рецептора человеческого эпидермального фактора роста. (см. статью Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-560 (1987)). Потенциальная проблема использования мышиных антител в терапевтическом лечении состоит в том, что нечеловеческие моноклональные антитела могут распознаваться человеком-хозяином как чужеродный белок; вследствие этого повторные инъекции данных чужеродных антител могут привести к индукции иммунных ответов, ведущих к вредным реакциям гиперчувствительности. Для моноклональных антител на основе мышиных данный эффект часто обозначают как ответ человеческого антитела к мыши или ответ "НАМА" либо ответ человеческого антитела к крысе или "НАРА". Кроме того, данные "чужеродные" антитела могут быть атакованы иммунной системой хозяина, так что они, в сущности, нейтрализуются до того, как достигнут своего целевого центра. Более того, у нечеловеческих моноклональных антител (например, мышиных моноклональных антител), как правило, отсутствует функциональность человеческого эффектора, т.е. они неспособны в числе прочего опосредовать комплемент-зависимый лизис или лизировать человеческие клетки-мишени посредством антитело-зависимой клеточной токсичности или опосредованного Fc-рецептором фагоцитоза.

Химерные антитела, включающие части антител, выделенные у двух или более различных видов (например, мыши и человека), разработаны в качестве альтернативы "конъюгированным" антителам. Например, в патенте США No. 5891996 (выданном Mateo de Acosta del Rio et al.) обсуждают химерное антитело типа мышь/человек, R3, направленное на EGFR, и в патенте США No. 5558864 обсуждают создание химерных и гуманизированных форм мышиного анти-EGFR MAb 425. Кроме того, IMC-C225 (Erbix®; ImClone) представляет собой химерное мышиное/человеческое моноклональное антитело к EGFR (на основе мышиного моноклонального антитела M225, которое приводит к ответам НАМА в клинических испытаниях на человеке), которое, как показано, проявляет

противоопухолевую активность в различных моделях ксенотрансплантатов человека. (см. статью Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)).

Эффективность IMC-C225 приписывают нескольким механизмам, включая ингибирование клеточных событий, регулируемых путями передачи сигнала EGFR и, возможно, повышенной активностью антителозависимой клеточной токсичности (ADCC) (см. статью Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)).

IMC-C225 также использовали в клинических испытаниях, в том числе в комбинации с радиотерапией и химиотерапией (см. статью Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). Недавно фирма Abgenix, Inc. (Fremont, CA) разработала ABX-EGF для терапии рака. ABX-EGF представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело к EGFR. (см. статью Yang et al., Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38: 17-23 (2001)).

Гликозилирование антител

Олигосахаридный компонент может в существенной степени воздействовать на свойства, относящиеся к эффективности терапевтического гликопротеина, включая физическую стабильность, устойчивость к действию протеазы, взаимодействия с иммунной системой, фармакокинетику и специфическую биологическую активность. Данные свойства могут зависеть не только от присутствия или отсутствия, но также от специфических структур олигосахаридов. Можно вывести ряд общих правил относительно связи структуры олигосахарида и функции гликопротеина. Например, некоторые олигосахаридные структуры опосредуют быстрое выведение гликопротеина из кровотока посредством взаимодействий со специфическими связывающими углеводы белками, тогда как другие могут связываться антителами и запускать нежелательные иммунные реакции. (см. статью Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами при получении терапевтических гликопротеинов вследствие своей способности гликозилировать белки в наиболее совместимой форме для введения человеку. (см. статьи Cumming et al., Glycobiology 1:115-30 (1991); Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)). Бактерии очень редко гликозилируют белки и, подобно другим типам обычных хозяев, таким как клетки дрожжей, филаментозных грибов, насекомых и растений, дают образцы

гликозилирования, ассоциированные с быстрым выведением из кровеносной системы, нежелательными иммунными реакциями и, в некоторых особых случаях, пониженной биологической активностью. Среди клеток

5 млекопитающих клетки яичников китайского хомячка (CHO) наиболее широко использовали в два последних десятилетия. Кроме того, что они дают подходящие типы гликозилирования, данные клетки обеспечивают возможность

10 постоянной генерации генетически стабильных высокопродуктивных клональных клеточных линий. Их можно культивировать до высокой густоты в простых биореакторах при использовании бессывороточных сред, и это дает возможность разработки безопасных и воспроизводимых биопроцессов. Другие

15 обычно используемые клетки животных включают клетки почки детеныша китайского хомячка (BHK), клетки мышинной миеломы NS0 и SP2/0. Совсем недавно протестировано также получение трансгенных животных. (см. статью

20 Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях константных областей тяжелой цепи, причем каждый изотип

25 обладает отличающимся рядом N-связанных углеводных структур, которые регулирующим образом воздействуют на сборку белка, секрецию или функциональную активность. (см. статью Wright, A. и Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Структура присоединенного N-связанного углевода

30 значительно изменяется в зависимости от степени процессинга и может включать сложные олигосахариды с высоким содержанием маннозы, множеством ветвей, а также биантеннальные олигосахариды. (см. статью Wright,

35 A. и Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Как правило, имеет место гетерогенный процессинг олигосахаридных структур ядра, присоединенных к определенному центру гликозилирования, так что однородные моноклональные

40 антитела существуют в виде множества гликоформ. Аналогичным образом показано, что основные отличия в гликозилировании антител существуют между клеточными линиями, и даже наблюдают минимальные различия для данной клеточной линии, выращенной в различных условиях культивирования. (см.

45 статью Lively, M. R. et al., *Glycobiology* 5(8):813-22 (1995)).

Одним путем получения большого увеличения активности при сохранении простого процесса продукции и потенциальном избежании существенных

50

5 нежелательных побочных эффектов является усиление естественных
 опосредованных клетками эффекторных функций моноклональных антител
 посредством конструирования их олигосахаридного компонента, как описано в
 статье Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) и патенте США No.
 6602684, содержание которых включено в данном контексте в виде ссылки во
 всей своей полноте. Антитела типа IgG1, наиболее часто используемые антитела
 10 в иммунотерапии рака, представляют собой гликопротеины, которые имеют
 консервативный N-связанный центр гликозилирования в положении Asn297 в
 каждом CH2-домене. Два сложных биантеннальных олигосахарида,
 15 присоединенные к Asn297, скрытые между CH2-доменами, формируют
 обширные контакты с полипептидным скелетом, и их присутствие важно для
 опосредования антителом эффекторных функций, таких как антителозависимая
 клеточная цитотоксичность (ADCC) (см. статьи Lively, M. R., et al., Glycobiology
 20 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163:59-76 (1998); Wright, A. and
 Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15:26-32 (1997)).

25 Umaña et al. ранее показали, что сверхэкспрессия в клетках яичников
 китайского хомячка (CHO) $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III
 ("GnTIII"), гликозилтрансферазы, катализирующей формирование раздвоенных
 олигосахаридов, существенно повышает *in vitro* активность ADCC
 30 антинейробластомных химерных моноклональных антител (chCE7),
 продуцируемых инженерными клетками CHO. (см. статью See Umaña, P. et al.,
 Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) и Международную публикацию No. WO
 99/54342, полное содержание которых включено в данном контексте в виде
 35 ссылки). Антитело chCE7 принадлежит к большому классу неконъюгированных
 mAb, которые обладают высокой аффинностью и специфичностью в отношении
 опухоли, но имеют слишком низкую активность для клинического применения
 40 при образовании стандартными промышленными клеточными линиями, у
 которых отсутствует фермент GnTIII (см. статью Umana, P., et al., Nature
 Biotechnol. 17:176-180 (1999)). Данное исследование было первым, которое
 45 показало, что значительное увеличение активности ADCC можно было бы
 получить конструированием продуцирующих антитело клеток,
 экспрессирующих GnTIII, что приводит также к увеличению доли связанных с
 Fc константной области раздвоенных олигосахаридов, включая раздвоенные
 50

негликозилированные олигосахариды, выше уровней, обнаруживаемых в природных антителах.

Сохраняется потребность в усовершенствованных терапевтических подходах, направленных на EGFR, предназначенных для лечения нарушений пролиферации клеток у приматов, включая, но без ограничения перечисленным, человека, где данные нарушения характеризуются экспрессией EGFR, особенно патологической экспрессией (например, сверхэкспрессией) включая, но без ограничения перечисленным, рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легкого, молочной железы, яичников, толстой кишки, простаты и почки.

Краткое описание изобретения

Признавая огромный терапевтический потенциал антигенсвязывающих молекул (АСМ), которые обладают специфичностью связывания крысиного антитела ICR62 (например, связывают тот же самый эпитоп) и которые были подвергнуты гликоинженерингу с целью повышения аффинности связывания Fc-рецептора и эффекторной функции, авторы настоящего изобретения разработали способ получения данных АСМ. Среди прочего данный способ включает получение рекомбинантных химерных антитела или их химерных фрагментов. Эффективность данных АСМ далее повышают путем конструирования профиля гликозилирования Fc-участка антитела.

В соответствии с этим в одном аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий: (а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:122 и SEQ ID NO:124; (б) последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106 и SEQ ID NO:126 и (в) SEQ ID NO:108. В другом аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий (а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:112 и SEQ ID NO:114; (б) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:116 и SEQ

ID NO:118 и (в) SEQ ID NO:119. В одном варианте осуществления любой из данных полинуклеотидов кодирует слитый полипептид.

В следующем аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:2; SEQ ID No:4; SEQ ID No:6; SEQ ID No:8; SEQ ID No:10; SEQ ID No:12; SEQ ID No:14; SEQ ID No:16; SEQ ID No:18; SEQ ID No:20; SEQ ID No:22; SEQ ID No:24; SEQ ID No:26; SEQ ID No:28; SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40 и SEQ ID No:120. В другом аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:50 и SEQ ID No.:52. В одном варианте осуществления данные полинуклеотиды кодируют слитые полипептиды.

Изобретение, кроме того, направлено на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No:2; SEQ ID No:4; SEQ ID No:6; SEQ ID No:8; SEQ ID No:10; SEQ ID No:12; SEQ ID No:14; SEQ ID No:16; SEQ ID No:18; SEQ ID No:20; SEQ ID No:22; SEQ ID No:24; SEQ ID No:26; SEQ ID No:28; SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40 и SEQ ID No:120, причем указанный выделенный полинуклеотид кодирует слитый полипептид. В дополнительном аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80% с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:50 и SEQ ID No.:52, причем указанный выделенный полинуклеотид кодирует слитый полипептид.

Изобретение направлено также на выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный полипептид, имеющий последовательность SEQ ID No.:1. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность SEQ ID No.:1, и последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность Fc-участка антитела, или ее фрагмент, выделенные у видов,

отличных от крысы. Изобретение направлено также на выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный полипептид, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7; SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; SEQ ID No:25; SEQ ID No:27; SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39 и SEQ ID No:121. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7; SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; SEQ ID No:25; SEQ ID No:27; SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39 и SEQ ID No:121, и последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность Fc-участка антитела, или ее фрагмент, выделенные у видов, отличных от крысы.

В еще одном аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный полипептид, имеющий последовательность SEQ ID No.:43. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность SEQ ID No.:43, и последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность Fc-участка антитела, или ее фрагмент, выделенные у видов, отличных от крысы. В еще одном аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный полипептид, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:45; SEQ ID No:49 и SEQ ID No.:51. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:45; SEQ ID No:49 и SEQ ID No.:51, и последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность константной области легкой цепи антитела (CL) или ее фрагмент, выделенные у видов, отличных от крысы.

Изобретение направлено также на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую полипептид, имеющий VH-область антитела ICR62 или ее функциональные варианты, и

последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность Fc-участка антитела, или ее фрагмент, выделенные у видов, отличных от крысы. В другом аспекте изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую полипептид, имеющий VL-область антитела ICR62, или ее функциональные варианты, и последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность CL-области антитела, или его фрагмент, выделенный у видов, отличных от крысы.

Изобретение, кроме того, направлено на экспрессирующий вектор, включающий любой из вышеописанных выделенных полинуклеотидов, и на клетку-хозяина, которая включает данный экспрессирующий вектор. В следующем аспекте изобретение направлено на клетку-хозяина, включающую любой из вышеописанных выделенных полинуклеотидов.

В одном аспекте изобретение направлено на выделенный полипептид, включающий: (а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:53 SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:125; (б) последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105 и SEQ ID NO:127 и (в) SEQ ID NO:107, причем указанный полипептид представляет собой слитый полипептид. В другом аспекте изобретение направлено на выделенный полипептид, включающий (а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:111 и SEQ ID NO:113; (б) SEQ ID NO:115 и (в) SEQ ID NO:117, причем указанный полипептид представляет собой слитый полипептид.

Изобретение направлено также на химерный полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO.:1 или ее вариант. Изобретение, кроме того, направлено на химерный полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO.:43 или ее вариант. В одном варианте осуществления любой из данных полипептидов, кроме того, включает человеческий Fc-участок и/или человеческую CL-область. Изобретение направлено также на химерный

полипептид, включающий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7; SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; SEQ ID No:25; SEQ ID No:27; SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39 и SEQ ID No:121, или ее вариант. Изобретение, кроме того, направлено на химерный полипептид, включающий последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID No:45; SEQ ID No:49 и SEQ ID No.:51 или ее варианта. В одном варианте осуществления любой из данных полипептидов, кроме того, включают человеческий Fc-участок и/или человеческую CL-область. В одном варианте осуществления человеческий Fc-участок включает IgG1.

В другом аспекте изобретение направлено на полипептид, включающий последовательность, выделенную из антитела ICR62, и последовательность, выделенную из гетерологичного полипептида, и на антигенсвязывающую молекулу, включающую данный полипептид. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело. В предпочтительном варианте осуществления антитело являются химерными. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело является гуманизированным или приматизированным.

В другом аспекте изобретение направлено на ACM, которая способна конкурировать с крысиным антителом ICR62 за связывание с EGFR и которая является химерной. В одном варианте осуществления ACM представляет собой антитело или ее фрагмент. В следующем варианте осуществления ACM представляет собой рекомбинантное антитело, включающее VH-область, имеющую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO.: 1; SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7; SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; SEQ ID No:25; SEQ ID No:27; SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39 и SEQ ID No:121. В другом варианте осуществления ACM представляет собой рекомбинантное антитело, включающее VL-область, имеющую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:43, SEQ ID No:45; SEQ ID No:49 и SEQ ID No.:51. В следующем варианте

осуществления АСМ представляет собой рекомбинантное антитело, которое является приматизированным. В еще одном варианте осуществления АСМ представляет собой рекомбинантное антитело, которое является гуманизированным. В другом варианте осуществления АСМ представляет собой рекомбинантное антитело, включающее человеческий Fc-участок. В следующем варианте осуществления любая из вышеописанных АСМ может быть конъюгирована с такой группой, как токсин или радиоактивная метка.

Изобретение, кроме того, направлено на АСМ, представленную в настоящем изобретении, причем указанная АСМ имеет модифицированные олигосахариды. В одном варианте осуществления модифицированные олигосахариды имеют пониженный уровень фукозилирования по сравнению с немодифицированными олигосахаридами. В других вариантах осуществления модифицированные олигосахариды представляют собой гибрид или комплекс. В следующем варианте осуществления АСМ имеет повышенную долю нефукозилированных олигосахаридов или раздвоенных нефукозилированных олигосахаридов на Fc-участке указанной молекулы. В одном варианте осуществления раздвоенные нефукозилированные олигосахариды являются гибридными. В следующем варианте осуществления раздвоенные нефукозилированные олигосахариды представляют собой комплекс. В одном варианте осуществления по меньшей мере 20% олигосахаридов на Fc-участке указанного полипептида являются нефукозилированными или раздвоенными нефукозилированными. В более предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75% либо более олигосахаридов являются нефукозилированными или раздвоенными нефукозилированными.

Изобретение, кроме того, направлено на полинуклеотид, кодирующий любую из вышеописанных АСМ, и на экспрессирующие векторы и клетки, включающие данный полинуклеотид.

Изобретение, кроме того, направлено на способ получения АСМ, которая способна конкурировать с крысиным антителом ICR62 за связывание с EGFR, и в котором указанная АСМ является химерной; указанный способ заключается в: (а) культивировании клетки-хозяина, включающей полинуклеотид, который кодирует АСМ, представленную в настоящем изобретении, в среде в условиях,

обеспечивающих экспрессию указанного полинуклеотида, кодирующего указанную АСМ, и (б) выделении указанной АСМ из полученной в результате культуры.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей АСМ, представленную в изобретении. Предполагают, что фармацевтическая композиция может, кроме того, включать фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию.

В следующем аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания, характеризующегося экспрессией EGFR (например, патологической или сверхэкспрессией EGFR). Способ заключается во введении терапевтически эффективного количества АСМ, представленной в настоящем изобретении, пациенту, предпочтительно пациенту-млекопитающему и более предпочтительно нуждающемуся в этом человеку. В предпочтительном варианте осуществления заболевание лечат введением АСМ, которая представляет собой химерное (например, гуманизированное) антитело или химерный фрагмент антитела. В одном варианте осуществления АСМ вводят в количестве от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 15,0 мг/кг. В другом варианте осуществления АСМ вводят в количестве от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 12,0 мг/кг. В следующем варианте осуществления АСМ вводят в количестве от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 4,5 мг/кг. В следующем варианте осуществления АСМ вводят в количестве от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 12,0 мг/кг. В следующем варианте осуществления АСМ вводят в количестве, выбранном из группы, состоящей из приблизительно 1,5, приблизительно 4,5 и приблизительно 12,0 мг/кг.

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, сконструированной для экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, обладающий активностью GnTIII, в количестве, достаточном для модификации олигосахаридов на Fc-участке АСМ, продуцируемой клеткой-хозяином, причем АСМ способна конкурировать с крысиным антителом ICR62 за связывание с EGFR и, причем АСМ является химерным. В одном варианте осуществления полипептид, обладающий активностью GnTIII, представляет собой слитый полипептид. В другом варианте осуществления АСМ, продуцируемая клеткой-хозяином, представляет собой

антитело или фрагмент антитела. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела является гуманизированным. В следующем варианте осуществления АСМ включает участок, эквивалентный Fc-участку человеческого IgG.

Изобретение направлено также на выделенный полинуклеотид, включающий по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять или шесть) участок, определяющий комплементарность крысиного антитела ICR62 или его вариант либо укороченную форму, включающую по меньшей мере остатки, определяющие специфичность, для указанного участка, определяющего комплементарность, причем указанный выделенный полинуклеотид кодирует слитый полипептид. Предпочтительно, когда данные выделенные полинуклеотиды кодируют слитый полипептид, который представляет собой антигенсвязывающую молекулу. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает три участка, определяющих комплементарность крысиного антитела ICR62, или их варианты либо укороченные формы, включающие по меньшей мере остатки, определяющие специфичность, для каждого из указанных трех участков, определяющих комплементарность. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует полную вариабельную область легкой или тяжелой цепи химерного (например, гуманизированного) антитела. Изобретение, кроме того, направлено на полипептиды, кодируемые данными полинуклеотидами.

В другом варианте осуществления изобретение направлено на антигенсвязывающую молекулу, включающую по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять или шесть) участок, определяющий комплементарность крысиного антитела ICR62 или его вариант либо укороченную форму, включающую по меньшей мере остатки, определяющие специфичность, для указанного участка, определяющего комплементарность, и включающую последовательность, выделенную из гетерологичного полипептида. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула включает три участка, определяющих комплементарность крысиного антитела ICR62, или их варианты либо укороченные формы, включающие по меньшей мере остатки, определяющие специфичность, для каждого из указанных трех участков, определяющих комплементарность. В другом аспекте

антигенсвязывающая молекула включает вариабельную область легкой или тяжелой цепи антитела. В одном особенно эффективном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой химерное, например гуманизированное, антитело. Изобретение направлено также на способы получения данных антигенсвязывающих молекул и их применение при лечении заболевания, в том числе злокачественных новообразований, таких как рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, яичников, толстой кишки, простаты, кожи и почки.

Клетка-хозяин, представленная в настоящем изобретении, может быть выбрана из группы, которая включает, но без ограничения перечисленным, клетку НЕК293-EBNA, клетку CHO, клетку BHK, клетку NSO, клетку SP2/0, клетку миеломы YO, клетку мышинной миеломы P3X63, клетку PER, клетку PER.C6 или гибридную клетку. В одном варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в изобретении, далее содержит трансфицированный полинуклеотид, включающий полинуклеотид, кодирующий VL-область крысиного антитела ICR62, или его варианты и последовательность, кодирующую участок, эквивалентный Fc-участку человеческого иммуноглобулина. В другом варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в изобретении, далее содержит трансфицированный полинуклеотид, включающий полинуклеотид, кодирующий VH-область крысиного антитела ICR62, или его варианты и последовательность, кодирующую участок, эквивалентный Fc-участку человеческого иммуноглобулина.

В следующем аспекте изобретение направлено на клетку-хозяина, которая продуцирует АСМ, которая проявляет повышенную аффинность связывания Fc-рецептора и/или повышенную эффекторную функцию в результате модификации ее олигосахаридов. В одном варианте осуществления повышенная аффинность связывания относится к Fc-рецептору, особенно рецептору FcγRIIIA. Эффекторная функция, рассматриваемая в данном контексте, может быть выбрана из группы, которая включает, но без ограничения перечисленным, повышенную Fc-опосредованную клеточную цитотоксичность, повышенный уровень связывания с НК-клетками (натуральными клетками-киллерами), повышенный уровень связывания с макрофагами, повышенный уровень

связывания с полиморфонуклеарными клетками, повышенный уровень
связывания с моноцитами, повышенный уровень прямой передачи сигнала
индукции апоптоза, повышенный уровень созревания дендритных клеток и
повышенный уровень примирования Т-клеток.

В следующем варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в
настоящем изобретении, включает по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту,
кодирующую полипептид, обладающий активностью GnTIII, который
функционально связан с конститутивным промоторным элементом.

В другом аспекте изобретение направлено на способ получения АСМ в
клетке-хозяине, заключающийся в: (а) культивировании клетки-хозяина,
сконструированной таким образом, чтобы она экспрессировала по меньшей мере
один полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид, обладающий
активностью GnTIII, в условиях, который обеспечивают продукцию данной
АСМ и которые обеспечивают модификацию олигосахаридов, присутствующих
на Fc-участке указанной АСМ, и (б) выделении указанной АСМ; причем
указанная АСМ способна конкурировать с крысиным антителом ICR62 за
связывание с EGFR и, причем указанная АСМ является химерной (например,
гуманизированной). В одном варианте осуществления полипептид, обладающий
активностью GnTIII, представляет собой слитый полипептид, предпочтительно
включающий каталитический домен GnTIII и домен локализации в аппарате
Гольджи гетерологичного полипептида, постоянно находящегося в аппарате
Гольджи, выбранный из группы, состоящей из домена локализации маннозидазы
II, домена локализации $\beta(1,2)$ -N-ацтилглюкозаминилтрансферазы I ("GnTI"),
домена локализации маннозидазы I, домена локализации $\beta(1,2)$ -N-
ацтилглюкозаминилтрансферазы II ("GnTII") и домена локализации $\alpha 1-6$ ядерной
фукозилтрансферазы. Предпочтительно, когда домен локализации в аппарате
Гольджи выделен из маннозидазы II или GnTI. В следующем аспекте
изобретение направлено на способ модификации профиля гликозилирования
АСМ к EGFR, продуцируемой клеткой-хозяином, заключающийся в
интродукции в клетку-хозяина по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты
или экспрессирующего вектора, представленных в изобретении. В одном
варианте осуществления АСМ представляет собой антитело или его фрагмент,
предпочтительно включающий Fc-участок IgG. Альтернативно полипептид

представляет собой слитый белок, который включает участок, эквивалентный Fc-участку человеческого IgG.

В одном аспекте изобретение относится к рекомбинантному химерному антителу или его фрагменту, способным конкурировать с крысиным антителом ICR62 за связывание с EGFR и имеющему пониженный уровень фукозилирования.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ модификации гликозилирования рекомбинантного антитела или его фрагмента, представленных в изобретении, с использованием слитого полипептида, обладающего активностью GnTIII, и включающего домен локализации в аппарате Гольджи гетерологичного полипептида, постоянно находящегося в аппарате Гольджи. В одном варианте осуществления слитые полипептиды, представленные в изобретении, включают каталитический домен GnTIII. В другом варианте осуществления, домен локализации в аппарате Гольджи выбран из группы, состоящей из домена локализации маннозидазы II, домена локализации GnTI, домена локализации маннозидазы I, домена локализации GnTII и домена локализации α 1-6 ядерной фукозилтрансферазы. Предпочтительно, когда домен локализации в аппарате Гольджи выделен из маннозидазы II или GnTI.

В одном варианте осуществления способ, представленный в изобретении, направлен на получение рекомбинантного химерного антитела или его фрагмента с модифицированными олигосахаридами, причем указанные модифицированные олигосахариды имеют пониженный уровень фукозилирования по сравнению с немодифицированными олигосахаридами. Согласно настоящему изобретению данные модифицированные олигосахариды могут быть гибридными или комплексными. В другом варианте осуществления способ, представленный в изобретении, направлен на получение рекомбинантного химерного (например, гуманизированного) антитела или его фрагмента, имеющего повышенное соотношение раздвоенных, нефукозилированных олигосахаридов на Fc-участке указанного полипептида. В одном варианте осуществления раздвоенные нефукозилированные олигосахариды являются гибридными. В другом варианте осуществления раздвоенные нефукозилированные олигосахариды являются комплексными. В

следующем варианте осуществления способ, представленный в изобретении, направлен на получение рекомбинантного химерного антитела или его фрагмента, содержащего по меньшей мере 20% олигосахаридов на Fc-участке указанного полипептида, которые являются раздвоенными нефукозилированными. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере 30% олигосахаридов на Fc-участке указанного полипептида, которые являются раздвоенными нефукозилированными. В другом предпочтительном варианте осуществления, в котором по меньшей мере 35% олигосахаридов на Fc-участке указанного полипептида являются раздвоенными нефукозилированными.

В следующем аспекте изобретение направлено на рекомбинантное химерное антитело или его фрагмент, который проявляет повышенную аффинность связывания Fc-рецептора и/или повышенную эффекторную функцию как результат модификации их олигосахаридов. В одном варианте осуществления повышенная аффинность связывания относится к Fc-активирующему рецептору. В следующем варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-активирующий рецептор, в частности рецептор FcγRIIIA. Эффекторная функция, рассматриваемая в данном контексте, может быть выбрана из группы, которая включает, но без ограничения перечисленным, повышенную Fc-опосредованную клеточную цитотоксичность, повышенный уровень связывания с NK-клетками, повышенный уровень связывания с макрофагами, повышенный уровень связывания с полиморфнуклеарными клетками, повышенный уровень связывания с моноцитами, повышенный уровень прямой передачи сигнала индукции апоптоза, повышенный уровень созревания дендритных клеток и повышенный уровень примирования Т-клеток.

В другом аспекте изобретение направлено на рекомбинантный химерный (например, гуманизированный) фрагмент антитела, обладающий специфичностью связывания крысиного антитела ICR62 и включающий Fc-участок, который сконструирован так, чтобы повысить эффекторную функцию, получаемый любым из способов, представленных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на слитый белок, который включает полипептид имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO.: 1; SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7;

SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; SEQ ID No:25; SEQ ID No:27; SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39 и SEQ ID No:121 и участок, эквивалентный Fc-участку иммуноглобулина и сконструированный так, чтобы повысить эффекторную функцию, полученный любым из способов, представленных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на слитый белок, который включает полипептид имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:43, SEQ ID No:45; SEQ ID No:49 и SEQ ID No.:51 и участок, эквивалентный Fc-участку иммуноглобулина и сконструированный так, чтобы повысить эффекторную функцию, полученный любым из способов, представленных в настоящем изобретении.

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на фармацевтическую композицию, включающую рекомбинантное химерное (например, гуманизированное) антитело, полученный любым из способов, представленных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом аспекте настоящее изобретение направлено на фармацевтическую композицию, включающую рекомбинантный, химерный (например, гуманизированный) фрагмент антитела, полученный любым из способов, представленных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом аспекте настоящее изобретение направлено на фармацевтическую композицию, включающую слитый белок, полученный любым из способов, представленных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

В следующем аспекте изобретение направлено на способ получения направленности *in vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих EGFR. В одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ получения направленности клеток, экспрессирующих EGFR, у пациента, заключающийся во введении пациенту композиции, включающей ACM, представленную в изобретении.

В еще одном аспекте настоящее изобретение направлено на способ детекции *in vivo* или *in vitro* присутствия EGFR в образце, например, для диагностики нарушения, связанного с экспрессией EGFR. В одном варианте осуществления детекцию осуществляют путем контактирования тестируемого

образца, необязательно с контрольным образцом с АСМ, представленной в
настоящем изобретении, в условиях, которые создают возможность
формирования комплекса АСМ и EGFR. Затем формирование комплекса
5 определяют (например, с помощью ELISA (твёрдофазного иммуноферментного
анализа) или других способов, известных в области техники). При
использовании контрольного образца с тест-образцом какая-либо статистически
10 значимая разница в формировании комплексов АСМ-EGFR при сравнении тест-
и контрольного образцов указывает на присутствие EGFR в тест-образце.

Изобретение, кроме того, направлено на способ лечения нарушения,
15 связанного с экспрессией EGFR, в частности, нарушения пролиферации клеток,
при котором экспрессируется EGFR, и, более конкретно, при котором
патологически экспрессируется EGFR (например, происходит сверхэкспрессия),
включая рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной
20 железы, лёгкого, молочной железы, яичников, простаты, кожи и почки,
закрывающийся во введении терапевтически эффективного количества
рекомбинантного, химерного (например, гуманизированного) антитела или его
фрагмента, полученного любым из способов, представленных в настоящем
25 изобретении, нуждающемуся в этом человеку.

Краткое описание фигур

30 На фиг. 1 представлена функциональная активность отдельных тяжёлых и
лёгких химерных полипептидных цепей крысиного антитела ICR62 к человеку
при комбинировании с гуманизированными конструкциями ICR62 I-HNC
(тяжёлая цепь) и I-KB (лёгкая цепь). гVL представляет химерную лёгкую цепь и
35 гVN представляет химерную тяжёлую цепь. Обозначение "г" показывают, что
вариабельные домены выделены из оригинального крысиного антитела.

На фиг. 2 представлена активность связывания гуманизированных антител
40 ICR62, включающих конструкции вариабельной области тяжёлой цепи I-HNC, I-
HNA и I-HLA, и гуманизированные конструкции вариабельной области лёгкой
цепи I-KA и I-KB, спаренные в различных конфигурациях.

45 На фиг. 3 представлена активность связывания гуманизированных антител
ICR62, включающих конструкции вариабельной области тяжёлой цепи I-HLB, I-
HLC и I-HLA, и гуманизированные конструкции вариабельной области лёгкой
цепи I-KA и I-KC, спаренные в различных конфигурациях.

На фиг. 4 представлена активность связывания гуманизированных антител ICR62, включающих конструкции вариабельной области тяжелой цепи I-HLA2, I-HLA3 и I-HLA4 и гуманизированную конструкцию вариабельной области легкой цепи I-KC по сравнению с химерным крысиным антителом ICR62 к человеку.

На фиг. 5 представлена активность связывания гуманизированных антител ICR62, включающих конструкции вариабельной области тяжелой цепи I-HLA1, I-HLA3, I-HLA5 и I-HLA6 и гуманизированную конструкцию вариабельной области легкой цепи I-KC по сравнению с химерным крысиным антителом ICR62 к человеку.

На фиг. 6 представлена активность связывания гуманизированных антител ICR62, включающих конструкции вариабельной области тяжелой цепи I-HLA7, I-HLA6 и I-HNB и гуманизированную конструкцию вариабельной области легкой цепи I-KC по сравнению с химерным крысиным антителом ICR62 к человеку.

На фиг. 7 представлена активность связывания гуманизированных антител ICR62, включающих конструкции вариабельной области тяжелой цепи I-HNF, I-HLA9 и I-HLA8 и гуманизированную конструкцию вариабельной области легкой цепи I-KC по сравнению с химерным крысиным антителом ICR62 к человеку.

На фиг. 8 представлена активность связывания гуманизированных антител, включающих конструкции вариабельных областей тяжелой цепи I-HNB, I-HND, I-HNG, I-HNF, I-HLA7 и I-HLA9 и гуманизированную конструкцию вариабельной области легкой цепи I-KC.

На фиг. 9 представлено сравнение опосредованной антителом клеточной цитотоксичности (ADCC) для различных гликоформ химерного антитела ICR62, а также для гуманизированных вариантов I-HLA4. Обозначение "G1" относится к гликоинженерингу антитела посредством соэкспрессии с GnTIII. Обозначение "G2" относится к гликоинженерингу антитела путем соэкспрессии с GnTIII и ManII. Обозначение "WT" относится к антителам, которые не подверглись гликоинженерингу. Конструкции гуманизированных тяжелых цепей спарены с конструкциями легкой цепи I-KC.

На фиг. 10 представлено сравнение ADCC для негликоинженерной формы (WT) и гликоформы G2 (т.е. гликоинженерной путем соэкспрессии с GnTIII и

ManII) конструкций гуманизированного антитела ICR62 I-HNB и I-HLA7. Те же антитела используют для двух различных клеточных линий-мишеней: на панели А используют клеточную линию-мишень LN229; на панели В используют клеточную линию А431. Конструкции гуманизированных тяжелых цепей спарены с конструкций легкой цепи I-KC.

На фиг. 11А и 11Б показано сравнение ADCC для негликоинженерных форм (WT) и гликоформ G2 конструкций химерного ICR62 и гуманизированного антитела ICR62 I-HNB и I-HLA7. Используют клеточную линию-мишень А431. Конструкции гуманизированных тяжелых цепей спарены с конструкций легкой цепи I-KC.

На фиг. 12 представлено сравнение 72-часовой ADCC для гликоформ G2 конструкций химерного ICR62 и гуманизированного антитела ICR62 I-HNB и I-HLA7. Конструкции гуманизированных тяжелых цепей спарены с конструкций легкой цепи I-KC.

На фиг. 13 представлен элайнмент последовательности аминокислот конструкций гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи ICR62 по сравнению с последовательностями крысиного ICR62. Точки означают идентичность остатков аминокислот в данном положении в данной конструкции.

На фиг. 14 представлен анализ связывания FcγRIIIa-Fc с использованием клеток СНО, представляющих рекомбинантный FcγRIIIa человека. Гликооструированное гуманизированное антитело IgG1 к EGFR, I-HNB/KC, сравнивают с негликоинженерным (Wt) антителом.

На фиг. 15 представлен олигосахаридный профиль MALD/TOF-MS для гликоинженерного гуманизированного антитела IgG1 к EGFR, I-HNB/KC. Гликоинженеринг осуществляют посредством сверхэкспрессии в продуцирующих антитело клетках генов, кодирующих ферменты с активностями GnTIII и Маннозидаза II аппарата Гольджи, дающих более 70% нефукозилированных Fc-Asn297-связанных олигосахаридов.

На фиг. 16 представлен точный профиль антитела к EGFR (n=6 повторностей через диапазон значений) для определения анти-EGFR в матрице 1% обезьяньей сыворотки (объединенная обезьянья сыворотка CMS25/31/33 с добавлением HLS).

На фиг. 17 представлена репрезентативная калибровочная кривая анти-EGFR для определения антитела к EGFR в матрице 1% обезьяньей сыворотки.

На фиг. 18 представлены сывороточные концентрации антитела к EGFR в день 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самцам обезьян макак-крабод.

На фиг. 19 представлены сывороточные концентрации антитела к EGFR в день 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самкам обезьян макак-крабод.

На фиг. 20 представлена связь между площадями под кривыми зависимости сывороточной концентрации антитела к EGFR от времени (AUC₁₆₈) и уровнем дозы в день 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR обезьянам макак-крабод.

На фиг. 21 представлены сывороточные концентрации антитела к EGFR во время еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самцам обезьян макак-крабод.

На фиг. 22 представлены сывороточные концентрации антитела к EGFR во время еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самкам обезьян макак-крабод.

На фиг. 23 представлен профиль олигосахаридов MALDI/TOF-MS из Fc-инженерного (гликоинженерного) антитела к EGFR, используемого в исследованиях обезьян *in vivo*, в данном контексте в нижеописанном примере.

На фиг. 24 представлено связывание с EGFR, экспрессирующимся на поверхности клеток эпидермоидной карциномы A431 человека. Антитело, используемое для изучения связывания представляет собой Fc-инженерное антитело к EGFR (конструкция I-HNB), используют для исследований *in vivo* на обезьянах, описанных в данном контексте в нижеприведенных примерах.

На фиг. 25 представлено связывание с EGFR, экспрессирующимся на поверхности клеток почки обезьян COS-7. Используемое антитело представляет собой антитело к EGFR (тяжелая цепь I-HNB; легкая цепь I-KC). В качестве эталонного связывания с клетками с низким уровнем экспрессии EGFR человека показаны клетки рака молочной железы MCF-7.

На фиг. 26 представлено связывание Fc-FcγRIIIa при использовании целой клетки (клетки CHO, сконструированные так, чтобы они экспрессировали

FcγRIIIa человека на своей поверхности). Используемое антитело представляет собой Fc-инженерное (гликоинженерное) антитело к EGFR, используемое для исследований *in vivo* на обезьянах, описанных в данном контексте в нижеприведенных примерах. Связывание не-Fc-инженерного (немодифицированного) контрольного антитела IgG1 показано для сравнения.

На фиг. 27 представлена ADCC, опосредованная Fc-инженерным (гликоинженерным) антителом к EGFR. Клетки-мишени представляют собой клетки карциномы легкого человека A549. Активность ADCC для не-Fc-инженерной (немодифицированной) формы антитела показана для сравнения.

На фиг. 28 представлена опосредованная Fc-инженерным (гликоинженерным) антителом к EGFR. Клетки-мишени представляют собой клеточную линию кератиноцитов обезьяны макак-крабод CYNOM-K1. Активность ADCC для не-Fc-инженерной (немодифицированной) формы антитела показана для сравнения.

На фиг. 29 представлена направленное связывание EGFR различных вариантов конструкции легкой цепи на основе конструкции I-KC, спаренной с конструкцией тяжелой цепи I-NHD.

Детальное описание изобретения

Термины используют в данном контексте как обычно используют в области техники, пока не определено иначе, как следует ниже.

Как используют в данном контексте, термин антитело предусматривает включение целых молекул антител, в том числе моноклональных, поликлональных и мультиспецифических (например, биспецифических) антител, а также фрагментов антител, имеющих Fc-участок, и сохраняющих специфичность связывания, и слитых белков, которые включают участок, эквивалентный Fc-участку иммуноглобулина, и которые сохраняют специфичность связывания. Кроме того, охватываются фрагменты антитела, которые сохраняют специфичность связывания, включая, но без ограничения перечисленным, фрагменты VH, фрагменты VL, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, фрагменты scFv, фрагменты Fv, минитела, диатела, триатела и тетраатела (см., например, статью Hudson и Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)). Охватываются также гуманизированные, приматизированные и химерные антитела.

Как используют в данном контексте, предусматривают, что термин Fc-участок относится к C-концевому участку тяжелой цепи IgG. Хотя связи Fc-участка тяжелой цепи IgG могут незначительно отличаться, обычно определяют, что Fc-участок тяжелой цепи IgG человека проходит от остатка аминокислоты в положении Cys226 до карбоксильного конца.

Как используют в данном контексте, термин участок, эквивалентный Fc-участку иммуноглобулина, предусматривают включение природных аллельных вариантов Fc-участка иммуноглобулина, а также варианты, имеющие изменения, которые дают замены, добавления или делеции, но которые не снижают в существенной мере способность иммуноглобулина к опосредованию эффекторных функций (таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность). Например, одну или более аминокислот можно исключить из N-конца или C-конца Fc-участка иммуноглобулина без существенной потери биологической функции. Данные варианты можно выбрать в соответствии с основными правилами, известными в области техники, чтобы они обладали минимальным действием на активность (см., например, статью Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-1310 (1990)).

Как используют в данном контексте, термин EGFR относится к рецептору человеческого эпидермального фактора роста (известного также как HER-1 или Erb-B1) (см. статью Ulrich, A. et al., Nature 309:418-425 (1984); SwissProt регистр. No P00533; вторичные регистр. номера: O00688, O00732, P06268, Q14225, Q92795, Q9BZS2, Q9GZX1, Q9H2C9, Q9H3C9, Q9UMD7, Q9UMD8, Q9UMG5), а также его природным изоформам или вариантам. Данные изоформы и варианты включают, но без ограничения перечисленным, вариант EGFRvIII, продукты альтернативного сплайсинга (например, как идентифицировано регистр. номерами SwissProt P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), варианты GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962 и PRO-988 (см. Livingston, R.J. et al., NIEHS-SNPs, проект генома, обусловленного окружающей средой, NIEHS ES15478, Отделение наук по геному, Сиэтл, WA (2004)) и другие, идентифицированные следующими регистр номерами: NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1, NM_201284.1 (REFSEQ мПНК); AF125253.1, AF277897.1, AF288738.1, AI217671.1, AK127817.1, AL598260.1, AU137334.1, AW163038.1, AW295229.1, BC057802.1, CB160831.1, K03193.1, U48722.1,

U95089.1, X00588.1, X00663.1; H54484S1, H54484S3, H54484S2 (комплекс MIPS); DT.453606, DT.86855651, DT.95165593, DT.97822681, DT.95165600, DT.100752430, DT.91654361, DT.92034460, DT.92446349, DT.97784849, DT.101978019, DT.418647, DT.86842167, DT.91803457, DT.92446350, DT.95153003, DT.95254161, DT.97816654, DT.87014330, DT.87079224 (комплекс DOTS).

Как используют в данном контексте, термин лиганд EGFR относится к полипептиду, который связывается и/или активирует EGFR. Термин включает связанные с мембраной формы предшественников лиганда EGFR, а также протеолитически процессированные растворимые формы лиганда EGFR.

Как используют в данном контексте, термин активация лигандом EGFR относится к сигнальной трансдукции (например, вызываемой внутриклеточным доменом киназы рецептора EGFR, фосфорилирующей остатки тирозина в EGFR или субстратном полипептиде), опосредованной связыванием лиганда EGFR.

Как используют в данном контексте, термин заболевание или нарушение, характеризующееся патологической активацией или продукцией EGFR или лиганда EGFR, либо нарушение, связанное с экспрессией EGFR, относится к состоянию, которое может включать или может не включать злокачественное заболевание или рак, при котором в клетках или тканях пациента, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, происходит патологическая активация и/или продукция EGFR и/или лиганда EGFR.

Как используют в данном контексте, термины сверхэкспрессирует, сверхэкспрессированный и сверхэкспрессия, как используют в связи с клетками, экспрессирующими EGFR, относятся к клеткам, которые имеют измеримо более высокие уровни EGFR на своей поверхности по сравнению с нормальной клеткой того же типа ткани. Данная сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией гена или повышенным уровнем транскрипции или трансляции. Экспрессию EGFR (и, следовательно, сверхэкспрессию) можно определить с помощью диагностического или прогностического анализа путем оценки уровней EGFR, присутствующих на поверхности клетки или в клеточном лизате, методами, известными в области техники: например, посредством иммуногистохимического анализа, иммунофлуоресцентного анализа, иммуноферментного анализа, ELISA (твердофазного иммуноферментного

анализа), проточной цитометрии, радиоиммуноанализа, вестерн-блоттинга, связывания лиганда, активности киназы и т.п. (см. в основном Cell Biology: A Laboratory Handbook, под ред. Celis, J., Academic Press (2 изд., 1998); Current Protocols in Protein Science, под ред. Coligan, J.E. et al., John Wiley & Sons (1995-2003); см. также статью Sumitomo et al., Clin. Cancer Res. 10: 794-801 (2004) (описывающие вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и иммуногистохимию), полное содержание которых включено в данном контексте в виде ссылки)). Альтернативно или дополнительно можно измерить уровни молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей EGFR, в клетке, например, посредством флуоресцентной гибридизации *in situ*, саузерн-блоттинга или ПЦР-методов. Уровни EGFR в нормальных клетках сравнивают с уровнями клеток, пораженных нарушением клеточной пролиферации (например, раком) с целью определения, происходит ли сверхэкспрессия EGFR.

Как используют в данном контексте, термин антигенсвязывающая молекула относится в своем самом широком смысле к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. Более подробно, антигенсвязывающая молекула, которая связывает EGFR, представляет собой молекулу, которая специфически связывается с трансмембранным рецептором 170 кД, как правило, называемом рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), но известным также как HER-1 или ErbB1. Под выражением "специфически связывает" понимают, что связывание является избирательным в отношении антигена и может быть дифференцировано от нежелательных или неспецифических взаимодействий.

Как используют в данном контексте, термины слитые и химерные при использовании в связи с полипептидами, такими как АСМ, относятся к полипептидам, включающим последовательности аминокислот, выделенные из двух или более гетерологичных полипептидов, таких как части антител, полученные у различных видов организмов. Для химерных АСМ, например, неантигенсвязывающие компоненты могут быть выделены из широкого круга видов, включая приматов, таких как шимпанзе и человек. Наиболее предпочтительно, когда константная область химерной АСМ в существенной степени идентична константной области природного человеческого антитела, наиболее предпочтительно, когда переменная область химерного антитела в

существенной степени идентична вариабельной области рекомбинантного антитела к EGFR, имеющей последовательность аминокислот мышинной вариабельной области. Гуманизированные антитела являются особенно предпочтительной формой слитого или химерного антитела.

Как используют в данном контексте, полипептид, обладающий активностью GnTIII, относится к полипептидам, которые способны катализировать введение остатка N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в β -1-4-связь с β -связанным маннозидом триманнозидового ядра N-связанных олигосахаридов. Это включает слитые полипептиды, проявляющие ферментную активность близкую, но необязательно идентичную активности β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, известной также как β -1,4-маннозил-гликопротеин 4- β -N-ацетилглюкозаминилтраснфераза (EC 2.4.1.144) согласно классификации Комитета по номенклатуре Международного биохимического и молекулярно-биологического союза (NC-IUBMB), как измеряют в определенном биологическом анализе с дозозависимостью или без дозозависимости. В случае, когда существует дозозависимость, не требуется, чтобы она была идентичной дозозависимости GnTIII, но предпочтительнее, когда она в существенной степени близка по дозозависимости при данной активности сравнительно с GnTIII (т.е., потенциальный полипептид будет проявлять более высокую активность или не больше чем приблизительно в 25 раз более низкую и предпочтительно не больше чем приблизительно в десять раз более низкую активность и наиболее предпочтительно не больше чем приблизительно в три раза более низкую активность относительно GnTIII).

Как используют в данном контексте, термин вариант (или аналог) относится к полипептиду, отличающемуся от специально описанного полипептида, представленного в изобретении, инсерциями, делециями и заменами аминокислот, полученному при использовании, например, технологий рекомбинантной ДНК. Варианты АСМ, представленной в настоящем изобретении, включают химерные, приматизированные или гуманизированные антигенсвязывающие молекулы, в которых один или несколько остатков аминокислот модифицированы заменой, введением и/или делецией так, что это в существенной степени не затрагивает аффинность связывания антигена (например, EGFR). Руководство по определению, какой из остатков аминокислот

можно заменить, ввести или исключить, не нарушая активностей, представляющих интерес, можно найти путем сравнения последовательности определенного полипептида с таковой гомологичных пептидов и сведения к минимуму числа изменений в последовательности аминокислот, сделанных на участках высокой гомологии (консервативных участках) или путем замены аминокислот консенсусной последовательностью.

Альтернативно рекомбинантные варианты, кодирующие данные одинаковые или близкие полипептиды, можно синтезировать, воспользовавшись "избыточностью" генетического кода. Можно интродуцировать различные замены кодонов, такие как молчащие изменения, которые образуют различные сайты рестрикции, с целью оптимизации клонирования в плазмиду или плазмидный вектор либо экспрессии в определенной прокариотической или эукариотической системе. Мутации в полинуклеотидной последовательности могут быть отражены в полипептид или доменах других пептидов, введенных в полипептид с целью модификации какой-либо части полипептида с целью изменения свойств, таких как лиганд-связывающие аффинности, аффинности между цепями или скорость разложения/оборота.

Предпочтительно, когда «замены» аминокислот представляют собой результат замены одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей близкие структурные и/или химические свойства, т.е. консервативные замены аминокислот. "Консервативные" замены аминокислот можно сделать на основе близости полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы включенных остатков. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин, и отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. "Инсерции" или "делеции" предпочтительно лежат в интервале от приблизительно 1 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 1 до 10 аминокислот. Допустимую вариацию можно экспериментально установить, методично делая инсерции, делеции или замены аминокислот в молекуле полипептида при использовании

технологий рекомбинантной ДНК и анализа полученных в результате рекомбинантных вариантов на активность.

Как используют в данном контексте, термин гуманизированный используют для обозначения антигенсвязывающей молекулы, выделенной из антигенсвязывающей молекулы нечеловека, например, мышинового антитела, которая сохраняет или в существенной степени сохраняет антигенсвязывающие свойства исходной молекулы, но которая менее иммуногенна в организме человека. Данный эффект достигается различными методами, включая (а) прививание целых нечеловеческих переменных доменов на человеческие константные области с целью генерации химерных антител, (б) прививание только нечеловеческих CDR на человеческий каркас и константные области при сохранении или без сохранения важных остатков каркаса (например, тех, которые важны для сохранения высокой аффинности связывания антигена или функций антитела) или (в) трансплантацию целых нечеловеческих переменных доменов, но "маскирование" их частью, подобной человеческой, посредством замещения поверхностных остатков. Данные методы описаны в статьях Jones et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994), все из которых включены в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте. В каждом из переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела, как правило, имеется 3 участка, определяющих комплементарность, или CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), которые фланкированы четырьмя каркасными субучастками (т.е., FR1, FR2, FR3 и FR4) в каждом из переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Обсуждение гуманизированных антител можно найти, среди прочего, в патенте США No. 6632927 и в опубликованной заявке США No. 2003/0175269, обе из которых включены в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте.

Аналогично, как используют в данном контексте, термин приматизированная используют для обозначения антигенсвязывающей молекулы, выделенной из антигенсвязывающей молекулы неприматов, например, мышинового антитела, которое сохраняет или в существенной степени

сохраняет антигенсвязывающие свойства исходной молекулы, но которая менее иммуногенна для приматов.

В случае, когда существует два или более определений термина, который используют и/или принимают в области техники, определение термина, как используют в данном контексте, предусматривает включение всех данных значений, пока однозначно не утверждают противоположное. Специальным примером является использование термина "участок, определяющий комплементарность" ("CDR") для описания несоседних центров, комбинирующих антигены, обнаруженных в вариабельной области полипептидов обеих, тяжелой и легкой, цепей. Данный конкретный участок описан в статьях Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), которые включены в данном контексте в виде ссылки, в которых определения включают перекрытия подгрупп остатков аминокислот при сравнении друг с другом. Тем не менее, использование любого из описаний относительно CDR антитела или его вариантов предусматривает включение в объем термина, как определяют и используют в данном контексте. Соответствующие остатки аминокислот, которые охватывают CDR, как описано в любой из вышеприведенных ссылок, приведены ниже в табл. 1 для сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают определенный CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Компетентные специалисты в области техники могут рутинно установить, какие остатки включают определенный CDR, соответствующий последовательности аминокислот вариабельной области антитела.

Таблица 1 Определения CDR¹

	Kabat	Chothia	AbM ²
VH CDR1	31-35	26-32	26-35
VH CDR2	50-65	52-58	50-58
VH CDR3	95-102	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32	24-34
VL CDR2	50-56	50-52	50-56
VL CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ Нумерация всех определений CDR в табл. 1 дана в соответствии с соглашениями о нумерации, приведенными в работе Kabat et al. (см. ниже).

² "AbM" относится к CDR, как определено Оксфордской программой молекулярного моделирования антител "AbM".

Kabat et al. также определяют систему нумерации для последовательности переменного домена, которая применима для любого антитела. Обычный специалист в области техники может однозначно применить данную систему "нумерации Kabat" к любой последовательности переменного домена вне зависимости от экспериментальных данных относительно самой последовательности. Как используют в данном контексте, "нумерация Kabat" относится к системе нумерации, приведенной Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Пока не определено иначе, ссылки на нумерацию положений специфических остатков аминокислот в ACM соответствуют системе нумерации Kabat. Последовательности в перечне последовательностей (т.е., SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:127) не нумеруют согласно системе нумерации Kabat. Однако, как указано выше, в компетенцию обычного специалиста в области техники в действительности входит определение схемы нумерации Kabat любой последовательности переменной области в Перечне последовательностей на основе нумерации последовательностей, как представлено в данном контексте.

Под выражением нуклеиновая кислота или полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" эталонной нуклеотидной последовательности, представленной в настоящем изобретении, подразумевают, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности может быть исключено или замещено другим нуклеотидом, или в эталонную последовательность может быть введено число

нуклеотидов до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности.

На практике, является ли определенная молекула нуклеиновой кислоты или полипептида по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеотидов или последовательность полипептида, представленной в настоящем изобретении, можно определить, стандартно используя известные компьютерные программы. Предпочтительный метод определения наилучшего общего соответствия запрашиваемой последовательности (последовательности, представленной в настоящем изобретении) и рассматриваемой последовательности, также называемый общим элайнментом последовательности, можно определить с использованием компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме, предложенном в статье Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). При элайнменте последовательности обе, запрашиваемая и рассматриваемая последовательности, представляют собой последовательности ДНК. Последовательность РНК можно сравнить путем превращения У в Т. Результат указанного общего элайнмента последовательности представляют в проценте идентичности. Предпочтительными параметрами, используемыми в элайнменте последовательностей ДНК с помощью FASTDB для расчета процента идентичности, являются: Матрица=Унитарная, k-кортеж=4, Штраф за ошибочное спаривание=1, Штраф за соединение=30, Длина рандомизационной группы=0, Результат отсечки=1, Штраф за гэл=5, Штраф за размер гэпа=0,05, Размер окна=500 или длина рассматриваемой нуклеотидной последовательности, если она короче.

Если рассматриваемая последовательность короче, чем запрашиваемая последовательность вследствие 5'- или 3'-делеций, но не вследствие внутренних делеций, результат подлежит коррекции вручную. Это обусловлено тем, что программа FASTDB не учитывает 5'- и 3'-укорочения рассматриваемой последовательности при расчете процента идентичности. Для рассматриваемой последовательности, укороченной по 5'- или 3'-концам относительно запрашиваемой последовательности процент идентичности корректируют путем расчета числа оснований запрашиваемой последовательности, которые представляют собой 5'- и 3'- рассматриваемой последовательности, которые не

спариваются/выравниваются, как процент от всех оснований запрашиваемой последовательности. Спаривается/выравнивается ли нуклеотид, определяют по результатам элайнмента последовательности FASTDB. Данный процент затем вычитают из процента идентичности, рассчитанного вышеуказанной программой FASTDB при использовании специальных параметров, чтобы получить конечный результат процента идентичности. Данный скорректированный результат является тем, который используют для целей настоящего изобретения. Для целей корректировки вручную итога процента идентичности рассчитывают только основания, не включенные в 5'- и 3'-основания рассматриваемой последовательности, как представлено в элайнменте FASTDB, которые не спариваются/выравниваются относительно запрашиваемой последовательности.

Например, рассматриваемую последовательность из 90 оснований выравнивают относительно запрашиваемой последовательности из 100 оснований, чтобы определить процент идентичности. Делеции имеются на 5'-конце рассматриваемой последовательности, и вследствие этого элайнмент с помощью FASTDB не показывает спаривания/выравнивания первых 10 оснований на 5'-конце. 10 неспаренных оснований составляют 10% последовательности (число неспаренных оснований на 5'- и 3'-концах/общее число оснований в запрашиваемой последовательности), поэтому 10% вычитают из итогового процента идентичности, рассчитанного программой FASTDB. Если бы оставшиеся 90 оснований полностью спаривались, конечный процент идентичности составлял бы 90%. В другом примере рассматриваемую последовательность из 90 оснований сравнивают с запрашиваемой последовательностью из 100 оснований. Теперь делеции представляют собой внутренние делеции, поэтому на 5' или 3' рассматриваемой последовательности отсутствуют основания, которые не спариваются/выравниваются с запросом. В данном случае процент идентичности, рассчитанный с помощью FASTDB не подлежит коррекции вручную. Снова только основания 5' и 3' рассматриваемой последовательности, которые не спариваются/выравниваются с запрашиваемой последовательностью, подлежат коррекции вручную. В целях настоящего изобретения не делают никаких других коррекций вручную.

Под полипептидом, имеющим последовательность аминокислот по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" запрашиваемой

последовательности аминокислот, представленной в настоящем изобретении, подразумевают, что последовательность аминокислот рассматриваемого полипептида идентична запрашиваемой последовательности за исключением того, что рассматриваемая полипептидная последовательность может включать до пяти изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот запрашиваемой последовательности аминокислот. Другими словами для получения полипептида, имеющего последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную запрашиваемой последовательности аминокислот, до 5% остатков аминокислот в рассматриваемой последовательности могут быть введены, исключены или замещены другой аминокислотой. Данные изменения эталонной последовательности могут находиться в аминок- или карбоксиконцевых положениях эталонной последовательности аминокислот или где-либо между концевыми положениями, будучи расположенными либо по отдельности между остатками эталонной последовательности, либо в одной или более следующих друг за другом групп в эталонной последовательности.

Практически является ли какой-либо конкретный полипептид по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным эталонному полипептиду, можно определить принятым образом, используя известные компьютерные программы. Предпочтительный метод определения наилучшего общего соответствия запрашиваемой последовательности (последовательности, представленной в настоящем изобретении) и рассматриваемой последовательности, также называемый общим элайнментом последовательности, можно определить с использованием компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме, предложенном в статье Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). При элайнменте последовательности запрашиваемая и рассматриваемая последовательности, представляют собой обе либо нуклеотидные последовательности, либо последовательности аминокислот. Результат указанного общего элайнмента последовательности представляют как процент идентичности. Предпочтительными параметрами, используемыми в элайнменте аминокислот с помощью FASTDB, являются: Матрица=PAM, k-кортеж=2, Штраф за ошибочное спаривание=1, Штраф за соединение=20, Длина рандомизационной группы=0, Результат отсечки=1, Размер окна=длина последовательности, Штраф за гэп=5, Штраф за размер гэпа=0,05, Размер

окна=500 или длина рассматриваемой нуклеотидной последовательности, если она короче.

Если рассматриваемая последовательность короче, чем запрашиваемая последовательность вследствие N- или C-концевых делеций, но не вследствие внутренних делеций, результат подлежит коррекции вручную. Это обусловлено тем, что программа FASTDB не учитывает N- и C-концевые укорочения рассматриваемой последовательности при расчете общего процента идентичности. Для рассматриваемых последовательностей, укороченных по N- или C-концам относительно запрашиваемой последовательности, процент идентичности корректируют путем расчета числа остатков запрашиваемой последовательности, которые представляют собой N- и C-конец рассматриваемой последовательности, которые не спариваются/выравниваются с соответствующим рассматриваемым остатком, как процент от всех оснований запрашиваемой последовательности. Спаривается/выравнивается ли остаток, определяют по результатам элайнмента последовательности FASTDB. Данный процент затем вычитают из процента идентичности, рассчитанного вышеуказанной программой FASTDB при использовании определенных параметров, чтобы получить конечный итоговый процент идентичности. Данный конечный результат по проценту идентичности является тем, который используют для целей настоящего изобретения. Для целей корректировки вручную итога процента идентичности рассматривают только остатки, относящиеся к N- и C-концам рассматриваемой последовательности, которые не спариваются/выравниваются относительно запрашиваемой последовательности. Таким образом учитывают только положения запрашиваемых остатков, не включающие самые дальние N- и C-концевые остатки рассматриваемой последовательности.

Например, рассматриваемую последовательность из 90 остатков аминокислот выравнивают относительно запрашиваемой последовательности из 100 остатков, чтобы определить процент идентичности. Делеции имеются на N-конец рассматриваемой последовательности, и вследствие этого элайнмент с помощью FASTDB не показывает спаривания/выравнивания первых 10 остатков на N-конец. 10 неспаренных остатков составляют 10% последовательности (число неспаренных остатков на N- и C-концах/общее число остатков в

запрашиваемой последовательности), поэтому 10% вычитают из итогового процента идентичности, рассчитанного программой FASTDB. Если бы оставшиеся 90 оснований полностью спаривались, конечный процент идентичности составлял бы 90%. В другом примере рассматриваемую последовательность из 90 остатков сравнивают с запрашиваемой последовательностью из 100 остатков. Теперь делеции представляют собой внутренние делеции, поэтому на N- или C-концах рассматриваемой последовательности отсутствуют основания, которые не спариваются/выравниваются с запросом. В данном случае процент идентичности, рассчитанный с помощью FASTDB, не подлежит коррекции вручную. Снова только положения концевых остатков вне N- и C-концов рассматриваемой последовательности, как показано при элайнменте с помощью FASTDB, которые не спариваются/выравниваются с запрашиваемой последовательностью, подлежат коррекции вручную. В целях настоящего изобретения не делают никаких других коррекций вручную.

Как используют в данном контексте, выражение нуклеиновая кислота, которая "гибридуется в жестких условиях" с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в изобретении, относится к полинуклеотиду, который гибридизуется при инкубировании в течение ночи при 42°C в растворе, включающем 50% формамид, 5×SSC (750 мМ NaCl, 75 мМ цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 7,6), 5×раствор Денхардта, 10% декстрансульфат и 20 мкг/мл денатурированной деградированной в результате гидродинамического сдвига ДНК молок лосося, с последующим промыванием фильтров в 0,1×SSC при приблизительно 65°C.

Как используют в данном контексте, термин домен локализации в аппарате Гольджи относится к последовательности аминокислот постоянно находящегося в аппарате Гольджи полипептида, который отвечает за заякоривание полипептида в положении в аппарате Гольджи. Как правило, домены локализации включают аминоконцевые "хвосты" фермента.

Как используют в данном контексте, термин эффекторная функция относится к тем биологическим активностям, которые относят к Fc-участку (Fc-участок нативной последовательности или последовательность аминокислот варианта Fc-участка) антитела. Примеры эффекторных функций антитела

включают, но без ограничения перечисленным, аффинность связывания Fc-рецептора, антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, опосредованное иммунным комплексом, понижающая регуляция рецепторами клеточной поверхности и т.п.

Как используют в данном контексте, термины конструировать, инженерный, инженерия и инженерия гликозилирования предусматривают включение любой манипуляции с типом гликозилирования природного или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Инженерия гликозилирования включает метаболическое конструирование аппарата гликозилирования клетки, в том числе генетические манипуляции путей синтеза олигосахаридов с целью достижения измененного гликозилирования гликопротеинов, экспрессированных в клетках. Более того, инженерия гликозилирования включает эффекты мутаций и клеточной среды на гликозилирование. В одном варианте осуществления инженерия гликозилирования представляет собой изменение активности гликозилтрансферазы. В конкретном варианте осуществления конструирование приводит к измененной активности глюкозаминилтрансферазы и/или активности фукозилтрансферазы.

Как используют в данном контексте, термин клетка-хозяин покрывает любой тип клеточной системы, который может быть сконструирован для генерации полипептидов и антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления клетку-хозяина конструируют, чтобы обеспечить возможность получения антигенсвязывающей молекулы с модифицированными гликоформами. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, фрагмент антитела или слитый белок. В ряде вариантов осуществления с клетками-хозяевами проводят дальнейшие манипуляции с целью получения экспрессии повышенных уровней одного или более полипептидов, обладающих активностью GnTIII. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки HEK293-EBNA, клетки BHK, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки мышинной миеломы P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 или

гибридомные клетки, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, называя только некоторые, но также клетки, содержащиеся в организмах трансгенных животных, трансгенных растениях или культивируемой ткани растений или животных.

Как используют в данном контексте, термин Fc-опосредованная клеточная цитотоксичность включает антителозависимую клеточную цитотоксичность и клеточную цитотоксичность, опосредованную растворимым Fc-слитым белком, включающим человеческий Fc-участок. Это представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису “клеток-мишеней антитела” посредством “человеческих иммунных эффекторных клеток”, в котором:

Человеческие иммунные эффекторные клетки являются популяцией лейкоцитов, которая представляет на своей поверхности Fc-рецепторы, посредством которых они связываются с Fc-участком антител или Fc-слитых белков и проявляют эффекторные функции. Данная популяция может включать, но без ограничения перечисленным, мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и/или натуральные клетки-киллеры (NK).

Клетки-мишени антитела представляют собой клетки, связанные антителами или Fc-слитыми белками. Антитела или Fc-слитые белки связываются с клетками-мишенями посредством N-конца белковой части с Fc-участком.

Как используют в данном контексте, термин повышенная Fc-опосредованная клеточная цитотоксичность определяют как-либо увеличение числа “клеток-мишеней антитела”, которые лизируются в заданный период времени при данной концентрации антитела или Fc-слитого белка, в среде, окружающей клетки-мишени, посредством механизма вышеописанной Fc-опосредованной клеточной цитотоксичности, и/или уменьшение концентрации антитела или Fc-слитого белка в среде, окружающей клетки-мишени, требующейся для осуществления лизиса заданного числа “клеток-мишеней антитела” в заданное время посредством механизма Fc-опосредованной клеточной цитотоксичности. Повышение уровня Fc-опосредованной клеточной цитотоксичности относительно клеточной цитотоксичности, опосредованной тем же самым антителом или Fc-слитым белком, образуемым тем же типом клеток-хозяев при использовании одинаковых стандартных методов получения,

очистки, изготовления и хранения, которые известны компетентным специалистам в данной области, но который не образуется клетками-хозяевами, сконструированными для экспрессии гликозилтрансферазы GnTIII способами, описанными в данном контексте.

Под выражением антитело, имеющее повышенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), понимают антитело, как данный термин определяют в данном контексте, обладающее повышенной ADCC, как определяют любым подходящим методом, известным обычному специалисту в данной области. Один принятый анализ ADCC *in vitro* представляет собой следующее:

- 1) в анализе используют клетки-мишени, которые заведомо экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антиген-связанным участком антитела;
- 2) в анализе используют мононуклеарные клетки периферической крови (PBMCs), выделенные из крови случайным образом выбранного здорового донора, в качестве эффекторных клеток;
- 3) анализ проводят согласно следующему протоколу:

- i) PBMCs выделяют с использованием стандартных процедур центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют с плотностью 5×10^6 клеток/мл в среде для культивирования клеток RPMI;
- ii) клетки-мишени выращивают стандартными методами культивирования тканей, собирают на экспоненциальной фазе роста с выживаемостью больше чем 90%, промывают в среде для культивирования клеток RPMI, метят $100 \text{ мКи } ^{51}\text{Сг}$, дважды промывают средой для культивирования клеток и ресуспендируют в среде для культивирования клеток с плотностью 10^5 клеток/мл;
- iii) 100 микролитров вышеописанной конечной суспензии клеток-мишеней переносят в каждую лунку 96-луночного планшета для микротитрования;
- iv) антитело серийно разводят от 4000 нг/мл до 0,04 нг/мл в среде для культивирования клеток, и 50 микролитров полученных в результате разведений антитела добавляют к клеткам-мишеням в 96-луночные планшеты для микротитрования, тестируя в трех повторностях

различные концентрации антитела, покрывающие весь вышеуказанный интервал концентраций;

v) для контролей максимального высвобождения (MR) в 3

дополнительные лунки на планшете, содержащем меченые клетки-мишени, вводят 50 мкл 2% (об./об.) водного раствора неионогенного детергента (нонидет, Sigma, St. Louis) вместо раствора антитела (см. пункт iv выше);

vi) для контролей самопроизвольного высвобождения (SR) в 3

дополнительные лунки на планшете, содержащем меченые клетки-мишени, вводят 50 мкл среды для культивирования клеток RPMI вместо раствора антитела (см. пункт iv выше);

vii) затем 96-луночный планшет для микротитрования

центрифугируют при $50\times g$ в течение 1 минуты и инкубируют в течение 1 часа при 4°C ;

viii) 50 мкл суспензии PBMC (см. пункт i) добавляют в каждую лунку, чтобы получить соотношение эффектор:клетка-мишень 25:1, и планшеты помещают в термостат с атмосферой 5% CO_2 при 37°C в течение 4 часов;

ix) собирают бесклеточный супернатант из каждой лунки и

количественно определяют экспериментально высвободившуюся радиоактивность (ER), используя γ -счетчик;

x) процент специфического лизиса рассчитывают для каждой

концентрации антитела согласно формуле $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$,

где ER означает среднее значение радиоактивности, количественно измеренное (см. пункт ix выше) для данной концентрации антитела,

MR означает среднее значение радиоактивности, количественно

измеренное (см. пункт ix выше) для контролей MR (см. пункт v выше)

и SR означает среднее значение радиоактивности, количественно

измеренное (см. пункт ix выше) для контролей SR (см. пункт vi выше);

4) “повышенный уровень ADCC” определяют либо как повышение

максимального процента специфического лизиса, наблюдаемого в

тестируемом выше интервале концентраций антитела, и/либо снижение

концентрации антитела, требующейся для достижения половины от

максимального процента специфического лизиса, наблюдаемого при
тестированном выше интервале концентраций антитела. Повышение уровня
ADCC определяют относительно ADCC, измеренной с помощью
5 вышеописанного анализа, опосредованной тем же антителом, образуемым
клетками-хозяевами того же типа, при использовании тех же стандартных
методов получения, очистки, изготовления препарата и хранения, которые
10 известны компетентным специалистам в области техники, но которые не
образуются клетками-хозяевами, сконструированными для получения
сверхэкспрессии GnTIII.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим
15 молекулам, имеющим специфичность связывания крысиного ICR62 (т.е.
связываются с практически тем же эпитопом) и к обнаружению того факта, что
их эффекторные функции можно усилить с помощью измененного
20 гликозилирования. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая
молекула представляет собой химерное антитело. В предпочтительном варианте
осуществления изобретение направлено на химерные антитело или его
25 фрагмент, включающий один или более (например, один, два, три, четыре, пять
или шесть) CDR любой из SEQ ID NO:53-108 и/или SEQ ID NO:122-127.
В частности, в предпочтительном варианте осуществления изобретение
направлено на выделенный полинуклеотид, включающий: (а)
30 последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:54 SEQ ID
NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID
NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID
35 NO:122 и SEQ ID NO:124; (б) последовательность, выбранную из группы,
состоящей из: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ
ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID
40 NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID
NO:104, SEQ ID NO:106 и SEQ ID NO:126 и (в) SEQ ID NO:108. В другом
предпочтительном варианте осуществления изобретение направлено на
выделенный полинуклеотид, включающий (а) последовательность,
45 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:112 и SEQ
ID NO:114; (б) последовательность, последовательность, выбранную из группы,
состоящей из SEQ ID NO:116 и SEQ ID NO:118 и (в) SEQ ID NO:119. В одном
50

варианте осуществления любой из данных полинуклеотидов кодирует слитый полипептид.

В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула включает V_H-домен крысиного антитела ICR62, кодируемый SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, либо его вариант и немышиный полипептид. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение направлено на антигенсвязывающую молекулу, включающую V_L-домен крысиного антитела, кодируемый SEQ ID NO:43 или SEQ ID NO:44, либо его вариант и немышиный полипептид.

В другом аспекте изобретение направлено на антигенсвязывающие молекулы, включающие один или более (например, один, два, три, четыре, пять или шесть) укороченных CDR ICR62. Данные, укороченные CDR, будут включать, как минимум, определяющие специфичность остатки аминокислот для данного CDR. Под выражением "определяющий специфичность остаток" понимают те остатки, которые непосредственно включены во взаимодействие с антигеном. Как правило, только приблизительно от одной пятой до одной трети остатков данного CDR участвуют в связывании с антигеном. Определяющие специфичность остатки в конкретном CDR можно идентифицировать, например, посредством расчета межатомных контактов при трехмерном моделировании и определения вариабельности последовательности в положении данного остатка в соответствии со способами, описанными в статье Padlan et al., FASEB J. 9(1):133-139 (1995), содержание которой в данном контексте включено в виде ссылки во всей своей полноте.

Соответственно, изобретение направлено также на выделенный полинуклеотид, включающий по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять или шесть) участок, определяющий комплементарность, крысиного антитела ICR62 или его варианта либо укороченной формы, включающий по меньшей мере определяющие специфичность остатки для указанного участка, определяющего комплементарность, причем указанный выделенный полинуклеотид кодирует слитый полипептид. Предпочтительно, когда данные, выделенные полинуклеотиды кодируют слитый полипептид, который представляет собой антигенсвязывающую молекулу. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает три участка, определяющих комплементарность, крысиного антитела ICR62 или его вариантов либо

укороченных форм, содержащих по меньшей мере определяющие специфичность остатки для каждого из указанных трех участков, определяющих комплементарность. В одном варианте осуществления полинуклеотид включает по меньшей мере один из CDR, приведенных в табл. 2-5, ниже. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует целую вариабельную область легкой или тяжелой цепи химерного (например, гуманизированного) антитела. Изобретение, кроме того, направлено на полипептиды, кодируемые данными полинуклеотидами.

В другом варианте осуществления изобретение направлено на антигенсвязывающую молекулу, включающую по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять или шесть) участок, определяющий комплементарность, крысиного антитела ICR62 или его варианта либо укороченной формы, включающий по меньшей мере определяющие специфичность остатки для указанного участка, определяющего комплементарность, и содержащую последовательность, выделенную из гетерологичного полипептида. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула включает три участка, определяющих комплементарность, крысиного антитела ICR62 или его вариантов либо укороченных форм, содержащих по меньшей мере определяющие специфичность остатки для каждого из указанных трех участков, определяющих комплементарность. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула включает по меньшей мере один из CDR, приведенных в табл. 2-5, ниже. В другом аспекте антигенсвязывающая молекула включает вариабельную область легкой или тяжелой цепи антитела. В одном особенно эффективном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой химерное, например, гуманизированное, антитело. Изобретение направлено также на способы получения данных антигенсвязывающих молекул и их применение при лечении заболевания, в частности нарушений пролиферации клетки, при которых происходит экспрессия EGFR, в частности, при которых происходит патологическая экспрессия (например, сверхэкспрессия) EGFR по сравнению с нормальной тканью из клеток того же типа. Данные нарушения включают, но без ограничения перечисленным, рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легкого, молочной железы,

яичников, толстой кишки, простаты и почки. Уровни экспрессии EGFR можно определить методами, известными в области техники и способами, описанными в данном контексте (например, с помощью иммуногистохимического анализа, иммунофлуоресцентного анализа, иммуноферментного анализа, ELISA, проточной цитометрии, радиоиммуноанализа, вестерн-блота, связывания лигандов, активности киназы и т.п.).

Изобретение направлено также на способ получения направленности *in vivo* или *in vitro* на клетки, экспрессирующие EGFR. Можно получить направленность на клетки, которые экспрессируют EGFR, для терапевтических целей (например, для лечения нарушения, которое лечится разрушением EGFR-опосредованной передачи сигнала, например, блокированием связывания лиганда или получением направленности на EGFR-экспрессирующие клетки для разрушения посредством иммунной системы). В одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ получения направленности на клетки, экспрессирующие EGFR у субъекта, заключающийся во введении пациенту композиции, включающей ACM, представленной в изобретении. Можно получить направленность на клетки, которые экспрессируют EGFR, для диагностических целей (например, для определения, экспрессируют ли они EGFR, либо нормально, либо патологически). Таким образом, изобретение направлено также на способы детекции присутствия EGFR или клетки, экспрессирующей EGFR, либо *in vivo*, либо *in vitro*. Один способ детекции экспрессии EGFR, представленный в настоящем изобретении, включает контактирование тестируемого образца, необязательно вместе с контрольным образцом, с ACM, представленной в настоящем изобретении, в условиях, которые создают возможность формирования комплекса между ACM и EGFR. Затем формирование комплекса определяют (например, с помощью ELISA или других методов, известных в области техники). При использовании контрольного образца вместе с тест-образцом любая статистически значимая разница в формировании комплексов ACM-EGFR при сравнении тест- и контрольного образцов указывает на присутствие EGFR в тест-образце.

Таблица 2

CDR		Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
CDR1 тяжелой	Kabat	GACTACAAGATACAC	54
		GACTACGCCATCAGC	56

CDR		Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
цепи	Chothia	GACTACTATATGCAC	58
		GACTACAAGATATCC	122
		GGTTTTACATTCACACTGACTAC	60
		GGTTACACATTCACACTGACTAC	62
		GGTTATTCATTCACACTGACTAC	64
	AbM	GGTTTTACATTCACACTGACTACAAGATACAC	66
		GGTTTTACATTCACACTGACTACGCCATCAGC	68
		GGTTTTACATTCACACTGACTACTATATGCAC	70
		GGTTACACATTCACACTGACTACTATATGCAC	72
		GGTTATTCATTCACACTGACTACAAGATACAC	74
		GGTTTCACATTCACACTGACTACAAGATATCC	124
CDR2 тяжелой цепи	Kabat	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTAC	76
		AATGAAAAGTTCAAGAGC	
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTAC	78
		GCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTAC	80
		GCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTAC	82
		GCACAGAAGTTTCAGGGC	
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTAC	84
		AGCCCAAGCTTCCAAGGC	
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTAC	86
		AACGAGAAGTTCCAAGGC	
	Chothia	TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAACTAC	88
		GCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACGTAC	90
		GCACAGAAGTTCCAGGGC	
	AbM	TACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTAC	126
		AGCCCAAGCTTCCAAGGC	
		AATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	92
		AACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	94
		AACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	96
		TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	98
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	100
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	102
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	104
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	106
CDR3 тяжелой цепи	Kabat Chothia AbM	CTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCC	108

Таблица 3

CDR		Последовательность аминокислот	SEQ ID NO
CDR1 тяжелой цепи	Kabat	DYKIH	53
		DYAIS	55
		DYYMH	57
		DYKIS	123
	Chothia	GFTFTDY	59
		GYTFTDY	61
		GYSFTDY	63
	AbM	GFTFTDYKIH	65
		GFTFTDYAIS	67

CDR		Последовательность аминокислот	SEQ ID NO
		GFTFTDYMH	69
		GYTFTDYMH	71
		GYSFTDYKH	73
		GFTFTDYKIS	125
CDR2 тяжелой цепи	Kabat	YFNPNSGYSTYNEKFKS	75
		GINPNSGYSTYAQKFQG	77
		YFNPNSGYSTYAQKFQG	79
		WINPNSGYSTYAQKFQG	81
		WINPNSGYSTYSPSFQG	83
		WINPNSGYSTYNEKFQG	85
		YFNPNSGYSNYAQKFQG	87
		YFNPNSGYATYAQKFQG	89
		YFNPNSGYSTYSPSFQG	127
	Chothia	NPNSGYST	91
		NPNSGYSN	93
		NPNSGYAT	95
	AbM	YFNPNSGYST	97
		GINPNSGYST	99
		WINPNSGYST	101
		YFNPNSGYSN	103
		YFNPNSGYAT	105
CDR3 тяжелой цепи	Kabat Chothia AbM	LSPGGYYVMDA	107

Таблица 4

CDR	Последовательность аминокислот	SEQ ID NO
CDR1 легкой цепи Kabat	KASQNINNYLN	111
	RASQGINNYLN	113
CDR2 легкой цепи Kabat	NTNNLQT	115
CDR3 легкой цепи Kabat	LQHNSFPT	117

Таблица 5

CDR	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
CDR1 легкой цепи Kabat	AAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAAC	112
	CGGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAAT	114
CDR2 легкой цепи Kabat	AATACAAACAATTTGCAAACA	116
	AATACCAACAAC TTGCAGACA	118
CDR3 легкой цепи Kabat	TTGCAGCATAATAGTTTTCCACG	119

Известно, что в терапевтической эффективности антител к EGFR участвует отдельный механизм, включающий блокирование лиганда (например, EGF, TGF-

α и т.п.), связывающегося с EGFR, и последующую активацию путей передачи сигнала, антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и индукцию остановки роста или терминальную дифференцировку.

Крысиное моноклональное антитело ICR62 (IgG2b) обсуждают в публикации PCT No. WO 95/20045, которая включена в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте. Оно направлено на С-эпитоп EGFR и, как показано, ингибирует связывание лиганда, ингибирует рост *in vitro* карцином сквамозных клеток, экспрессирующих EGFR, и индуцирует обратное развитие ксенотрансплантатов опухолей у бестимусных мышей (см. WO 95/20045; статью Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). Поскольку это полностью человеческое антитело, введение ICR62, крысиного моноклонального антитела, человеку у ряда пациентов приводит в результате к ответу HARA даже после однократной дозы. (см. WO 95/20045; статью Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

Описаны химерные мышинные/человеческие антитела. См., например, статью Morrison, S. L. et al., PNAS 11:6851-6854 (ноябрь 1984); Европейская патентная публикация No. 173494; статьи Boulianna, G. L. et al., Nature 312:642 (декабрь 1984); Neubeiger, M. S. et al., Nature 314:268 (март 1985); Европейская патентная публикация No. 125023; статьи Tan et al., J. Immunol. 135:8564 (November 1985); Sun, L. K et al., Hybridoma 5(1):517 (1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066-1074 (1986). См. в основном статьи Muron, Nature 312:597 (декабрь 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5(3) (март 1985); Marx, Science 229:455 (август 1985) и Morrison, Science 229:1202-1207 (сентябрь 1985). IMC-C225 (Erbix®), Imclone) представляет собой химерное моноклональное антитело, направленное на EGFR и имеющее мышиную переменную область и человеческую константную область (см. статью Herbst и Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Мышиная часть IMC-225 выделена из M225, которое, как показано, связывается с EGFR и ингибирует EGF-индуцированное тирозинкиназа-зависимое фосфорилирование, а также индуцирует апоптоз в опухолевых клеточных линиях, способных к сверхэкспрессии EGFR (см. статью Herbst и Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Однако M225 вызывают реакцию НАМА у пациентов, которых лечат антителом, на фазе I клинических испытаний (см. статью Herbst и Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). IMC-225 тестируют *in vivo* и

in vitro и используют в комбинации с радиотерапией и химиотерапией при ряде типов опухолей, включая ассоциированные с неблагоприятными прогнозами (см. статью Herbst и Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Однако IMC-225 связывают с токсичностью, такой как аллергические и кожные реакции у пациентов, которым вводят антитело IMC-225, в клинических испытаниях (см. статью Herbst и Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)).

В особенно предпочтительном варианте осуществления химерная АСМ, представленная в настоящем изобретении, является гуманизированным антителом. В области техники известны методы гуманизации нечеловеческих антител. Например, гуманизированную АСМ, представленную в настоящем изобретении, можно получить согласно способам, представленным в патенте США No. 5225539, выданном Winter, патенте США No. 6180370, выданном Queen et al., патенте США No. 6632927, выданном Adair et al., или опубликованной патентной заявке США No. 2003/0039649 Foote, полное содержание каждого из данных материалов включено в данном контексте в виде ссылки. Предпочтительно, когда гуманизированное антитело имеет один или более введенных в него остатков аминокислот, из источника, который не является человеком. Данные остатки аминокислот нечеловека часто называют "импортированными" остатками, которые, как правило, взяты из "импортированного" варибельного домена. Гуманизацию можно в основном провести согласно способу, предложенному Winter и соавторами (см. статьи Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей гиперварибельной области соответствующими последовательностями человеческого антитела. Соответственно данные "гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела (см. патент США No. 4816567), в которых существенно меньше чем интактный человеческий варибельный домен замещен соответствующей последовательностью, полученной от видов, отличных от человека. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки гиперварибельной области и, возможно, некоторые остатки FR (каркасной области) замещены остатками их аналогичных

центров антител грызунов. Данные гуманизированные антитела к EGFR будут включать константные области человеческого иммуноглобулина.

Выбор человеческих переменных доменов, обоих легких и тяжелых, для использования при получении гуманизированных антител очень важен в плане снижения антигенности. Согласно так называемому "оптимальному" методу, проводят скрининг последовательности переменного домена антитела грызунов относительно полной библиотеки последовательностей известных переменных доменов человека. Человеческую последовательность, которая наиболее близка к последовательности грызунов затем принимают как человеческую каркасную область (FR) для гуманизированного антитела (см. статьи Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Другой способ выбора человеческой каркасной последовательности состоит в сравнении последовательности каждого отдельного субучастка полного каркаса грызунов (т.е. FR1, FR2, FR3 и FR4) или какой-либо комбинации отдельных субучастков (например, FR1 и FR2) относительно библиотеки последовательностей известных человеческих переменных областей, которые соответствуют данному каркасному субучастку (например, как определено нумерацией Kabat) и выборе человеческой последовательности для каждого субучастка или комбинации, которые наиболее близки таковым грызунов (см. Leung, опубликованная патентная заявка США No. 2003/0040606A1 от 27 февраля 2003 г.) (полное содержание которой включено в данном контексте в виде ссылки). В другом способе используют определенную каркасную область, выделенную из консенсусной последовательности всех человеческих антител определенной подгруппы легкой или тяжелой цепей. Один и тот же каркас можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (см. статьи Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)) (полное содержание каждой из которых включено в данном контексте в виде ссылки).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированными при сохранении высокой аффинности в отношении антигена и других благоприятных биологических свойств. Для достижения данной цели в соответствии с предпочтительным способом гуманизированные антитела получают способом анализа исходных последовательностей и различных концептуальных

гуманизированных продуктов при использовании трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов можно получить при использовании компьютерных программ, известных компетентным специалистам в области техники (например, InsightII, Accelrys, Inc. (ранее MSI) или по адресу <http://swissmodel.expasy.org>). Данные компьютерные программы могут иллюстрировать и представить возможные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей иммуноглобулина. Проверка данных представлений дает возможность анализа вероятной роли остатков в функционировании потенциальной последовательности иммуноглобулинов, т.е. анализа остатков, которые влияют на способность потенциального иммуноглобулина связывать свой антиген. В данном случае остатки FR можно выбрать и скомбинировать из реципиентной и импортируемой последовательностей, чтобы получить требуемые свойства антитела, такие как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени. Как правило, остатки гипервариабельной области непосредственно и в наиболее существенной степени включены в воздействие на связывание антигена.

В одном варианте осуществления антитела, представленные в настоящем изобретении, включают человеческий Fc-участок. В специфическом варианте осуществления человеческая константная область представляет собой IgG1, как приведено в SEQ ID NO: 109 и 110 и приведено ниже:

Последовательность нуклеотидов IgG1 (SEQ ID NO: 110)

ACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC
GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGG
TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC

AGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Последовательность аминокислот IgG1 (SEQ ID NO:109)

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

Однако настоящее изобретение также охватывает варианты и изоформы человеческого Fc-участка. Например, варианты Fc-участков, подходящий для применения в настоящем изобретении, можно получить согласно способам, описанным в патенте США No. 6737056, выданном Presta (варианты Fc-участка с измененной эффекторной функцией вследствие модификаций одной или более аминокислот), или в патентных заявках США NoNo. 60/439498, 60/456041, 60/514549 или WO 2004/063351 (варианты Fc-участков с повышенной аффинностью связывания вследствие модификации аминокислот) или в патентной заявке США No. 10/672280 или WO 2004/099249 (Fc-варианты с измененным связыванием с FcγR вследствие модификации аминокислот), содержание каждой из которых включено в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте.

В другом варианте осуществления антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем изобретении, конструируют, чтобы получить повышенную аффинность связывания согласно, например, способам, описанным в патентной заявке США No. 2004/0132066, поданной Balint et al., полное содержание которой включено в данном контексте в виде ссылки.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем изобретении, конъюгируют с дополнительной группой, такой как радиоактивная метка или токсин. Данные конъюгированные АСМ можно получить множеством методов, которые хорошо известны в области техники.

В настоящем изобретении применимы разнообразные радионуклиды, и полагают, что компетентные специалисты способны легко определить, какой из

радионуклидов является наиболее подходящим в разных обстоятельствах.

Например, ^{131}I йод является хорошо известным радионуклидом, используемым для направленной иммунотерапии. Однако клиническая эффективность ^{131}I йода может быть ограничена рядом факторов, в том числе: восьмидневный период физического полураспада; дегалогенирование йодированного антитела как в крови, так и в областях опухоли, и характеристики эмиссии (например, большого γ -компонента), которые могут быть субоптимальными для локализованного отложения дозы в опухоли. С появлением улучшенных хелатирующих агентов возможность присоединения металл-хелатирующих групп к белкам улучшает перспективы использования других радионуклидов, таких как ^{111}In индий и ^{90}Y иттрий. ^{90}Y иттрий дает ряд преимуществ в плане применения в радиоиммунотерапевтических приложениях: 64-часовой период полураспада ^{90}Y иттрия является достаточно длинным, чтобы обеспечить накопление антитела в опухоли, и, в отличие, например, от ^{131}I йода, ^{90}Y иттрий представляет собой чистый источник β -излучения с высокой энергией без сопровождающего γ -излучения при его разложении с диапазоном в ткани 100-1000 диаметров клетки. Более того, минимальное количество проникающего излучения позволяет проводить амбулаторное введение меченных ^{90}Y иттрием антител. Кроме того, для уничтожения клетки не требуется интернализация меченого антитела, и местная эмиссия ионизирующего излучения была бы летальной для соседних опухолевых клеток, у которых отсутствует антиген-мишень.

Эффективные однократные лечебные дозы (т.е. терапевтически эффективные количества) меченных ^{90}Y иттрием антител к EGFR лежат в интервале от приблизительно 5 до приблизительно 75 мКи, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 40 мКи. Эффективные однократные лечебные не разрушающие костный мозг дозы меченных ^{131}I йодом антител к EGFR лежат в интервале от приблизительно 5 до приблизительно 70 мКи, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 40 мКи. Эффективные однократные аблятивные дозы (т.е. те, при которых может потребоваться трансплантация аутологичного костного мозга) меченных ^{131}I йодом антител к EGFR лежат в интервале от приблизительно

30 до приблизительно 600 мКи, более предпочтительно от приблизительно 50 до
 меньше чем приблизительно 500 мКи. В сочетании с химерным антителом к
 EGFR вследствие более длительного полупериода существования в системе
 5 кровообращения относительно мышечных антител эффективные однократные
 лечебные не разрушающие костный мозг дозы меченных ¹³¹Иодом химерных
 антител к EGFR лежат в интервале от приблизительно 5 до приблизительно 40
 10 мКи, более предпочтительно меньше чем приблизительно 30 мКи. Критерий
 визуализации для, например, метки ¹¹¹индия, как правило, составляет меньше
 чем приблизительно 5 мКи.

15 Относительно антител к EGFR с радиоактивной меткой, терапию с их
 использованием можно также проводить с помощью однократного
 терапевтического лечения или с помощью многократного лечения. В связи с
 радиоактивным компонентом предпочтительно, чтобы перед лечением были
 20 «собраны» периферические стволовые клетки ("PSC") или костный мозг ("BM")
 для пациентов, подвергающихся токсичности, потенциально летальной для
 костного мозга, обусловленной излучением. BM и/или PSC собирают, используя
 25 стандартные методы, и затем очищают и замораживают для возможной
 повторной инфузии. Кроме того, наиболее предпочтительно, когда перед
 лечением у пациента проводят диагностическое дозиметрическое исследование,
 используя диагностическое меченое антитело (например, с использованием
 30 ¹¹¹индия), целью которой является гарантировать, что терапевтически меченое
 антитело (например, с помощью ⁹⁰иттрия) не станет излишне
 "концентрированным" в любом нормальном органе или ткани.

35 В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение
 направлено на выделенный полинуклеотид, включающий последовательность,
 которая кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот,
 40 приведенную в табл. 7 ниже. В предпочтительном варианте осуществления
 изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий
 последовательность, представленную в табл. 6 ниже. Изобретение далее
 45 направлено на выделенную нуклеиновую кислоту, включающую
 последовательность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%
 или 99% идентичную последовательности нуклеотидов, показанной в табл. 6
 ниже. В другом варианте осуществления изобретение направлено на
 50

выделенную нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности аминокислот в табл. 7. Изобретение также охватывает выделенную нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот любой из конструкций, приведенных в табл. 7, с консервативными заменами аминокислот.

Таблица 6

Конструкция	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
ICR62 VH	CAGGTCAACCTACTGCAGTCTGGGGCTGCACTGGT GAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGTTGTCTTGCAAAG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACACT GGGTGAAGCAGAGTCATGGAAGAGCCTTGAGTG GATTGGGTATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTAC CTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAAGGCCACATTGA CTGCAGACAAATCCACCGATACAGCCTATATGGAG CTTACCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAACCTA TTACTGTACAAGACTATCCCCAGGGGGTACTATG TTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTCACT GTCTCCTC	2
I-HNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCTGGATTTACATTCACTGACTACGCCATCAGCT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGAGGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGGGTCACCAT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	4
I-HNB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGGGTCACCAT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	6

Конструкция	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
I-HHC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAGGGTCACCATT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	8
I-HLA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATG ACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	10
I-HLB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATG ACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	12
I-HLC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGAGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTACAGTA CTTACAACGAGAAGTTCAAGAGCCGGGTACCATG ACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGA GCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	14
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATACACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCAT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	16

Конструкция	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
I-HNE	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATATCCT GGGTGCGACAGGCTCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCAATT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	18
I-HHF	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCAATT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	20
I-HHG	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCA CGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCAATT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	22
I-HLA1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAGCCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	24
I-HLA2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	26

Конструкция	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
I-HLA3	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTACACATTCAGTACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	28
I-HLA4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTACACATTCAGTACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	30
I-HLA5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAA GAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCAGTACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	32
I-HLA6	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAA GAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCAGTACTACTATATGCACT GGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	34
I-HLA7	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAA GAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCAGTACTACAAGATCCACT GGGTGCGACAGGCCCCGCGGACAACGGCTCGAGTG GATCGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCA	36

Конструкция	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
I-HLA8	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGAA GAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCCACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	38
I-HLA9	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGATATTTCAACCTAACAGCGGTTATAGTA CCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATT ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTA TGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGA CCGTCTCCTCA	40
I-HLA10	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAGG GTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCACT GGGTGCGACAGATGCCTGGAAGGGCCTCGAGTG GATGGGCTACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTA CCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCAACATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCAGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTAT GTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGAC CGTCTCCTCAG	120
Сигнальная последовательность VH	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC	42
ICR62 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCATTCTGTCT GCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACTGCAA AGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAACTGGT ATCAGCAAAAGCTTGGAGAAGCTCCCAAACGCCTG ATATATAATACAAACAATTTGCAAACAGGCATCCC ATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATT ACACACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT TTTGCCACATATTTCTGCTTGCAGCATAATAGTTT CCCACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGA ACGTACG	44
I-KC	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCT GCATCTGTGCGAGACCGGGTCACCATCACCTGCCG GGCAAGTCAGGGCATTAACAATTACTTAAATTGGT ACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCTAAGCGCCT GATCTATAATACCAACAACCTTGACAGACAGGCGTCC CATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGA ATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAG ATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAGTT TTCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATC AAGCGTACG	46

Конструкция	Последовательность нуклеотидов	SEQ ID NO
Сигнальная последовательность VL	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT	48
I-KA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCTCGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCCGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATAATACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTCCATCAAGGTTTCAAGCGGAGTGGATCCGGGACAGATACTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAGTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGCGTACGGTG	50
I-KB	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCTCGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATAATACCAACAACCTTGCAGACAGGCGTCCATCAAGGTTTCAAGCGGAGTGGATCCGGGACAGATACTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAGTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGCGTACGGTG	52

Таблица 7

Конструкция	Последовательность аминокислот	SEQ ID NO
ICR62 VH	QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKGSGFTFTDYKIHWWKQSHGKSLEWIGYFNPNSGYSTYNEKFKSKATLTADKSTDTAYMELTSLSSEDSATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGASVTVSS	1
I-HHA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYAISWVRQAPGQGLEWMGGINPNNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	3
I-HHB	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWWVRQAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	5
I-HHC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWWVRQAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	7
I-HLA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWNPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	9
I-HLB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYKIHWWVRQAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSS	11

Конструкция	Последовательность аминокислот	SEQ ID NO
I-HLC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGFTFTDYKIHWVRQ APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTMTADTSIST AYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTV TVSS	13
I-HHD	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWVRQ APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTV TVSS	15
I-HHE	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKISWVRQ APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTV TVSS	17
I-HHF	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWVRQ APGQGLEWMGYFNPNSGYSNYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTV TVSS	19
I-HHG	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWVRQ APGQGLEWMGYFNPNSGYATYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTV TVSS	21
I-HLA1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTT VTVSS	23
I-HLA2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTT VTVSS	25
I-HLA3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTT VTVSS	27
I-HLA4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTT VTVSS	29
I-HLA5	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTT VTVSS	31
I-HLA6	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTT VTVSS	33
I-HLA7	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWVRQ ARGQRLEWIGWINPNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVT VSS	35
I-HLA8	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWVRQ APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTV TVSS	37

Конструкция	Последовательность аминокислот	SEQ ID NO
I-HLA9	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWVRQA PGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDVAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVT VSS	39
I-HLA10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWVRQ MPGKGLEWMGYFNPNSGYSTYSPSFQGGVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVT VSS	121
Сигнальная последовательность VH	MDWTWRILFLVAAATGAHS	41
ICR62 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITINCKASQNINNYLNWYQQKL GEAPKRLIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYFCLQHNSFPTFGAGTKLELKRT	43
I-KC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGINNYLNWYQQKP GKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCLQHNSFPTFGQGKLEIKRT	45
Сигнальная последовательность VL	MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC	47
I-KA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGINNYLNWYQQKP GKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPE DFATYYCLQHNSFPTFGQGKLEIKRTV	49
I-KB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQNINNYLNWYQQKP GKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPE DFATYYCLQHNSFPTFGQGKLEIKRTV	51

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на экспрессирующий вектор и/или клетку-хозяина, которые включают один или более выделенных полинуклеотидов, представленных в настоящем изобретении.

Как правило, для экспрессии ACM, представленной в настоящем изобретении, можно использовать культивируемую клеточную линию любого типа. В предпочтительном варианте осуществления клетки HEK293-EBNA, клетки CHO, клетки BHK, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки мышинной миеломы P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 или гибридные клетки, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или клетки растений используют в качестве основы клеточной линии для генерации сконструированных клеток-хозяев, представленных в изобретении.

Терапевтическую эффективность ACM, представленных в настоящем изобретении, можно повысить, получая их в клетке-хозяине, которая, кроме того, экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид, обладающий активностью GnTIII. В предпочтительном варианте осуществления полипептид, обладающий активностью GnTIII, представляет собой слитый полипептид,

включающий домен локализации в аппарате Гольджи полипептида, находящегося в аппарате Гольджи. В другом предпочтительном варианте осуществления экспрессия АСМ, представленных в настоящем изобретении, в клетке-хозяине, которая экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид, обладающий активностью GnTIII, приводит в результате к получению АСМ с повышенной аффинностью связывания Fc-рецептора и повышенной эффекторной функцией. Соответственно в одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на клетку-хозяина, включающую (а) выделенную нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью GnTIII, и (б) выделенный полинуклеотид, кодирующий АСМ, представленную в настоящем изобретении, такую как химерное, приматизированное или гуманизированное антитело, которое связывает человеческий EGFR. В предпочтительном варианте осуществления, полипептид, обладающий активностью GnTIII, представляет собой слитый полипептид, включающий каталитический домен GnTIII и домен локализации в аппарате Гольджи маннозидазы II. Методы генерации данных слитых полипептидов и их использования для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны в предварительной патентной публикации США No. 60/495142 и публикации патентной заявки США No. 2004/0241817 A1, полное содержание которых специально включено в данном контексте в виде ссылки. В другом предпочтительном варианте осуществления химерная АСМ представляет собой химерное антитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания крысиного антитела ICR62. В особенно предпочтительном варианте осуществления химерное антитело включает человеческий Fc. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело является приматизированным или гуманизированным.

В одном варианте осуществления один или несколько полинуклеотидов, кодирующих АСМ, представленную в настоящем изобретении, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или, альтернативно, регулируемой экспрессирующей системы. Подходящие регулируемые экспрессирующие системы включают, но без ограничения перечисленным, тетрациклин-регулируемую экспрессирующую систему, экдисон-индуцируемую

экспрессирующую систему, лас-переключаемую экспрессирующую систему, глюкокортикоид-индуцируемую экспрессирующую систему, температуриндуцируемую промоторную систему и металлотеининовым металлом индуцируемую экспрессирующую систему. Если ряд различных нуклеиновых кислот, кодирующих АСМ, представленную в настоящем изобретении, включены в систему клетки-хозяина, некоторые из них могут экспрессироваться под контролем конститутивного промотора, тогда как другие экспрессируются под контролем регулируемого промотора. Максимальный уровень экспрессии, как считают, является самым высоким возможным уровнем стабильной экспрессии полипептида, который не имеет существенного неблагоприятного эффекта на скорость роста клеток и будет определяться с использованием рутинного экспериментирования. Уровни экспрессии определяют методами, в основном известными в области техники, включая анализ вестерн-блоттинг с использованием антитела, специфического в отношении АСМ или антитела, специфического в отношении пептидной метки, слитой с АСМ, и анализа нозерн-блоттинга. В следующем альтернативном варианте полинуклеотид может быть функционально связан с сигнальным геном; уровни экспрессии химерной (например, гуманизированной) АСМ, имеющей в существенной степени такую же специфичность связывания, как крысиное антитело ICR62, определяют измерением сигнала, коррелирующего с уровнем экспрессии сигнального гена. Сигнальный ген можно транскрибировать вместе с нуклеиновой кислотой(ами), кодирующей указанный слитый полипептид, как одну молекулу мРНК; их соответствующие кодирующие последовательности могут быть связаны либо внутренним сайтом входа в рибосому (IRES), либо кэп-независимым энхансером трансляции (CITE). Сигнальный ген можно транслировать вместе с по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой, кодирующей химерную (например, гуманизированную) АСМ, имеющую в существенной степени такую же специфичность связывания, как крысиное антитело ICR62, так что формируется одна полипептидная цепь. Нуклеиновые кислоты, кодирующие АМВ, представленные в настоящем изобретении, могут быть функционально связаны с сигнальным геном под контролем одного промотора, так что нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид и сигнальный ген транскрибируются в молекулу РНК, которая альтернативно

сплайсируется в две отдельные молекулы информационной РНК (мРНК), одна из полученных в результате мРНК транслируется в указанный сигнальный белок, и другая транслируется в указанный слитый полипептид.

Методы, которые хорошо известны компетентным специалистам в области техники, можно использовать для конструирования экспрессирующих векторов, включающий кодирующую последовательность АСМ, имеющей в существенной степени такую же специфичность связывания, как крысиное антитело ICR62, наряду с соответствующими сигналами контроля транскрипции/трансляции. Данные методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинацию/генетическую рекомбинацию *in vivo*. См., например, методы, описанные в монографии Maniatis et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).

Ряд систем хозяин-экспрессирующий вектор можно использовать для экспрессии кодирующей последовательности АСМ, представленных в настоящем изобретении. Предпочтительно, когда клетки млекопитающих используют как системы клетка-хозяин, трансфицированные рекомбинантными векторами, экспрессирующими плазмидную ДНК или космидную ДНК, включающими кодирующую последовательность белка, представляющего интерес, и кодирующую последовательность слитого полипептида. Наиболее предпочтительно, когда в качестве системы клетка-хозяин используют клетки НЕК293-EBNA, клетки CHO, клетки ВНК, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки мышинной миеломы P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 или гибридные клетки, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или клетки растений. Некоторые примеры экспрессирующих систем и методов селекции описаны в следующих ссылках и ссылках в данном материале: Borth et al., *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73 (2000-2001), в статье Werner et al., *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), in Andersen и Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), в статье Chadd и Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001) и в статье Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). В альтернативных вариантах осуществления могут быть использованы другие системы эукариотическая клетка-хозяин, включая клетки

5 дрожжей, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми
экспрессирующими векторами, включающими кодирующую последовательность
АСМ, представленной в настоящем изобретении, таких как экспрессирующие
10 системы, описанные в патентной заявке США No. 60/344169 и WO 03/056914
(методы получения подобного человеческому гликопротеина в нечеловеческой
эукариотической клетке-хозяине) (содержание каждой из которых включено в
15 виде ссылки во всей своей полноте); системы клеток насекомых,
инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами
(например, бакуловирусными), включающими кодирующую последовательность
20 химерной АСМ, имеющей в существенной степени такую же специфичность
связывания, как крысиное антитело ICR62; системы клеток растений,
инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами
(например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики,
25 ВТМ) или трансформированных рекомбинантными плазмидными
экспрессирующими векторами (например, Ti-плазмидой), включающими
кодирующую последовательность АСМ, представленной в изобретении,
30 включая, но без ограничения перечисленным, экспрессирующие системы,
описанные в патенте США No. 6815184 (методы экспрессии и секреции
биологически активных полипептидов из генно-инженерной ряски); WO
2004/057002 (получение гликозилированных белков в клетках растений
35 бриофитов путем интродукции гена гликозилтрансферазы) и WO 2004/024927
(методы генерации внеклеточного гетерологичного нерастительного белка в
протопластах мха) и в патентных заявках США NoNo. 60/365769, 60/368047 и
40 WO 2003/078614 (процессинг гликопротеинов в трансгенных растениях,
включающий функциональный фермент млекопитающих GnTIII) (содержание
каждого из которых в данном контексте включено в виде ссылки во всей своей
полноте), или системы клеток животных, инфицированных рекомбинантными
45 вирусными экспрессирующими векторами (например, аденовирусными, на
основе вируса вакцины), включая клеточные линии, сконструированные так,
чтобы они содержали множество копий ДНК, кодирующей химерные АСМ,
имеющие в существенной степени такую же специфичность связывания, как
крысиное антитело ICR62, либо стабильно амплифицированных (CHO/dhfr),
50 либо нестабильно амплифицированных в двойных минихромосомах (например,

мышинные клеточные линии). В одном варианте осуществления вектор, включающий полинуклеотид(ы), кодирующий АСМ, представленную в изобретении, является полицистронным. Кроме того, в одном варианте осуществления обсуждаемая выше АСМ представляет собой антитело или его фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гуманизированные антитело.

Для способов, представленных в данном изобретении, стабильная экспрессия обычно более предпочтительна, чем временная экспрессия, поскольку она, как правило, позволяет достигнуть более воспроизводимых результатов и, кроме того, является более пригодной для крупномасштабного получения. Предпочтительнее, чем использовать экспрессирующие векторы, которые включают вирусные ориджины репликации, клетки-хозяева можно трансформировать соответствующие кодирующие нуклеиновые кислоты, контролируемые подходящими элементами контроля экспрессии (например, промоторные, энхансерные последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т.п.) и селектируемый маркер. После интродукции чужеродной ДНК сконструированным клеткам можно позволить расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах и затем переключать на селективные среды. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде дает устойчивость к отбору и обеспечивает возможность отбора клеток, которые стабильно интегрируют плазмиду в свои хромосомы, и выращивания для получения центров, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены с образованием клеточных линий.

Можно использовать ряд систем отбора, включая, но без ограничения перечисленным, тимидинкиназу вируса простого герпеса (см. статью Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (см. статью Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962)) и аденинфосфорибозилтрансферазу (см. статью Lowy et al., Cell 22:817 (1980)), гены, которые можно использовать в tk-, hgp^rt- или ap^rt-клетках, соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может быть использована как основа отбора по генам dhfr, который дает устойчивость к метотрексату (см. статьи Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:3567 (1989); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, который дает устойчивость к

микофеноловой кислоте (см. статью Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); нео, который дает устойчивость к аминогликозиду G-418 (см. статью Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)) и hygro, который дает

устойчивость к гигромицину (см статью Santerre et al., Gene 30:147 (1984)).
Недавно описаны дополнительные селективируемые гены, а именно: trpB, который дает клеткам возможность использовать индол вместо триптофана; hisD, который дает клеткам возможность использовать гистинол вместо гистидина (см. статью Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); система глутаминсинтазы и ODC (орнитиндекарбоксилазы), которая дает устойчивость к ингибитору орнитиндекарбоксилазы, 2-(дифторметил)-DL-орнитину, DFMO (см. McConlogue, в монографии: Current Communications in Molecular Biology, изд. Cold Spring Harbor Laboratory (1987)).

Настоящее изобретение далее направлено на способ модификации профиля гликозилирования АСМ, представленных в настоящем изобретении, которые продуцирует клетка-хозяин, заключающийся в экспрессии в указанной клетке-хозяине нуклеиновой кислоты, кодирующей АСМ, представленной в изобретении, и нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с активностью GpTIII или вектор, включающий данные нуклеиновые кислоты.

Предпочтительно, когда модифицированный полипептид представляет собой IgG или его фрагмент, включающий Fc-участок. В особенно предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент.

Модифицированная АСМ, продуцируемая клетками-хозяевами, представленными в изобретении, проявляет повышенную аффинность связывания Fc-рецептора и/или повышенную эффекторную функцию как результат модификации. В особенно предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент, включающий Fc-участок. Предпочтительно, когда повышенная аффинность связывания Fc-рецептора представляет собой повышенный уровень связывания с Fcγ-активирующим рецептором, таким как рецептор FcγRIIIa. Повышенная эффекторная функция предпочтительно представляет собой повышение одного или более из следующих факторов: повышенная антителозависимая клеточная цитотоксичность, повышенный антителозависимый клеточный фагоцитоз

(ADCP), повышенный уровень секреции цитокинов, повышенный уровень опосредованного иммунным комплексом поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенная Fc-опосредованная клеточная цитотоксичность, повышенный уровень связывания с NK-клетками, повышенный уровень связывания с макрофагами, повышенный уровень связывания с полиморфнонуклеарными клетками (PMN), повышенный уровень связывания с моноцитами, повышенный уровень перекрестного связывания антител, связанных с мишенью, повышенный уровень прямой передачи сигнала индукции апоптоза, повышенный уровень созревания дендритных клеток и повышенный уровень примирования Т-клеток.

Настоящее изобретение направлено также на способ получения АСМ, представленной в настоящем изобретении, имеющей модифицированные олигосахариды, в клетке-хозяине, заключающийся в (а) культивировании клетки-хозяина, сконструированной так, чтобы она экспрессировала по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, обладающий активностью GnTIII, в условиях, которые обеспечивают возможность продукции АСМ, представленной в настоящем изобретении, причем указанный полипептид, обладающий активностью GnTIII, экспрессируется в количестве, достаточном для модификации олигосахаридов на Fc-участке указанной АСМ, продуцируемой указанной клеткой-хозяином, и (б) выделении указанной АСМ. В предпочтительном варианте осуществления полипептид, обладающий активностью GnTIII, представляет собой слитый полипептид, включающий каталитический домен GnTIII. В особенно предпочтительном варианте осуществления слитый полипептид далее включает домен локализации в аппарате Гольджи полипептида, находящегося в аппарате Гольджи.

Предпочтительно, когда домен локализации в аппарате Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II или GnTI. Альтернативно домен локализации в аппарате Гольджи выбран из группы состоящей из: домена локализации маннозидазы I, домена локализации GnTII и домена локализации α 1-6 ядерной фукозилтрансферазы. АСМ, полученные способами, представленными в настоящем изобретении, обладают повышенной аффинностью связывания Fc-рецептора и/или повышенной эффекторной функцией. Предпочтительно, когда повышенная эффекторная функция

представляет один или более из следующих факторов: повышенная Fc-опосредованная клеточная цитотоксичность (включая повышенную антителозависимую клеточную цитотоксичность), повышенный антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), повышенный уровень секреции цитокинов, повышенный уровень опосредованного иммунным комплексом поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенный уровень связывания с NK-клетками, повышенный уровень связывания с макрофагами, повышенный уровень связывания с моноцитами, повышенный уровень связывания с полиморфонуклеарными клетками, повышенный уровень прямой передачи сигнала индукции апоптоза, повышенный уровень перекрестного связывания антител, связанных с мишенью, повышенный уровень созревания дендритных клеток или повышенный уровень примирования Т-клеток. Повышенная аффинность связывания Fc-рецептора предпочтительно представляет собой повышенный уровень связывания с Fc-активирующими рецепторами, такими как FcγRIIIa. В особенно предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на химерную АСМ, имеющую в существенной степени такую же специфичность связывания, как крысиное антитело ICR62, полученную способами, представленными в изобретении, которая имеет повышенное содержание раздвоенных олигосахаридов на Fc-участке указанного полипептида. Принимают, что данная АСМ охватывает антитела и их фрагменты, включающие Fc-участок. В предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гуманизированное антитело. В одном варианте осуществления доля раздвоенных олигосахаридов на Fc-участке АСМ 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. В еще одном варианте осуществления АСМ, полученная способами, представленными в изобретении, имеет повышенное содержание нефукозилированных олигосахаридов на Fc-участке в результате модификации ее олигосахаридов способами, представленными в настоящем изобретении. В одном варианте

5 осуществления доля нефукозилированных олигосахаридов составляет по
меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%-70%, наиболее
предпочтительно по меньшей мере 75%. Нефукозилированные олигосахариды
10 могут быть гибридными или комплексного типа. В особенно предпочтительном
варианте осуществления АСМ, полученная с помощью клеток-хозяев и
способов, представленных в изобретении, имеет повышенное содержание
15 раздвоенных нефукозилированных олигосахаридов на Fc-участке. Раздвоенные
нефукозилированные олигосахариды могут быть либо гибридными, либо
комплексными. В частности, способы, представленные в настоящем
изобретении, можно использовать для получения АСМ, в которой по меньшей
20 мере 15%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно
по меньшей мере 25%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более
предпочтительно по меньшей мере 35% олигосахаридов на Fc-участке АСМ
являются разделенными нефукозилированными. Способы, представленные в
25 настоящем изобретении, можно также использовать для получения
полипептидов, в которых по меньшей мере 15%, более предпочтительно по
меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 25%, более
предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей
30 мере 35% олигосахаридов на Fc-участке полипептида являются раздвоенными
гибридными нефукозилированными.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на
химерную АСМ, имеющую в существенной степени такую же специфичность
35 связывания, как крысиное антитело ICR62, сконструированную для повышения
эффекторной функции и/или повышения аффинности связывания Fc-рецептора,
полученную способами, представленными в изобретении. Предпочтительно,
когда повышенная эффекторная функция представляет один или более из
40 следующих факторов: повышенная Fc-опосредованная клеточная
цитотоксичность (включая повышенную антителозависимую клеточную
цитотоксичность), повышенный антителозависимый клеточный фагоцитоз
(ADCP), повышенный уровень секреции цитокинов, повышенный уровень
45 опосредованного иммунным комплексом поглощения антигена
антигенпрезентирующими клетками, повышенный уровень связывания с NK-
клетками, повышенный уровень связывания с макрофагами, повышенный

уровень связывания с моноцитами, повышенный уровень связывания с полиморфонуклеарными клетками, повышенный уровень прямой передачи сигнала индукции апоптоза, повышенный уровень перекрестного связывания антител, связанных с мишенью, повышенный уровень созревания дендритных клеток или повышенный уровень примирования Т-клеток. В предпочтительном варианте осуществления повышенная аффинность связывания Fc-рецептора представляет собой повышенный уровень связывания с Fc-активирующим рецептором, таким как FcγRIIIa. В одном варианте осуществления АСМ представляет собой антитело, фрагмент антитела, включающий Fc-участок, или слитый белок, который включает участок, эквивалентный Fc-участку иммуноглобулина. В особенно предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гуманизированное антитело.

Настоящее изобретение, кроме того, направлено на фармацевтические композиции, включающие АСМ, представленную в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение далее направлено на применение данных фармацевтических композиций в способе лечения рака. Более подробно, настоящее изобретение направлено на способ лечения рака, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, представленной в изобретении.

Настоящее изобретение далее представляет способы генерации и применения систем клетка-хозяин для получения гликоформ АСМ, представленных в настоящем изобретении, имеющих повышенную аффинность связывания Fc-рецептора, предпочтительно повышенный уровень связывания с Fc-активирующими рецепторами и/или обладающий повышенными эффекторными функциями, в том числе антителозависимой клеточной цитотоксичностью. Методы гликоинженерии, которые могут быть использованы с АСМ, представленными в настоящем изобретении, описаны более детально в патенте США No. 6602684, опубликованной патентной заявке США No. 2004/0241817 A1, опубликованной патентной заявке США No. 2003/0175884 A1, предварительной патентной заявке США No. 60/441307 и WO 2004/065540, полное содержание каждой из которых включено в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте. АСМ, представленные в настоящем изобретении,

могут быть альтернативно гликоинженерными, чтобы уменьшить содержание остатков фукозы на Fc-участке согласно методам, описанным в опубликованной патентной заявке США No. 2003/0157108 (Genentech) или в EP 1 176 195 A1 ,
5 WO 03/084570, WO 03/085119 и опубликованных патентных заявках США NoNo. 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa).

Содержание каждого из данных документов включено в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте. Гликоинженерные АСМ, представленные в изобретении, можно получить также в экспрессирующих системах, которые продуцируют модифицированные гликопротеины, такие как описаны в
10 опубликованной патентной заявке США No. 60/344169 и WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) или в WO 2004/057002 и WO 2004/024927 (Greenovation), содержание каждой из которых включено в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте.

20 Генерация клеточных линий для получения белков с измененным типом гликозилирования

Настоящее изобретение представляет экспрессирующие системы клетки-хозяина для генерации АСМ, представленных в настоящем изобретении, имеющих модифицированные типы гликозилирования. В частности, настоящее изобретение представляет системы клетка-хозяин для генерации гликоформ АСМ, представленных в настоящем изобретении, имеющих повышенную терапевтическую ценность. В связи с этим изобретение представляет экспрессирующие системы клетка-хозяин, выбранные или сконструированные для экспрессии полипептида, обладающего активностью GnTIII. В одном
25 варианте осуществления полипептид, обладающий активностью GnTIII, представляет собой слитый полипептид, включающий домен локализации в аппарате Гольджи гетерологичного полипептида, находящегося в аппарате Гольджи. В частности данные экспрессирующие системы клетка-хозяин можно сконструировать так, чтобы они включали рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, имеющий GnTIII,
30 функционально связанный с конститутивной или регулируемой промоторной системой.

В одном специфическом варианте осуществления настоящее изобретение представляет клетку-хозяина, которая сконструирована, чтобы экспрессировать

по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый полипептид, обладающий активностью GnTIII и включающую домен локализации в аппарате Гольджи гетерологичного полипептида, находящегося в аппарате Гольджи. В одном аспекте клетку-хозяина конструируют с использованием молекулы нуклеиновой кислоты, включающей по меньшей мере один ген, кодирующий слитый полипептид, обладающий активностью GnTIII и включающий домен локализации в аппарате Гольджи гетерологичного полипептида, находящегося в аппарате Гольджи.

Как правило, культивируемую клеточную линию любого типа, в том числе обсуждаемые выше клеточные линии, можно использовать в качестве основы для конструирования линий клеток-хозяев, представленных в настоящем изобретении. В предпочтительном варианте осуществления клетки HEK293-EBNA, клетки CHO, клетки BHK, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки мышинной миеломы P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 или гибридные клетки, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или клетки растений используют в качестве основы клеточной линии для генерации инженерных клеток-хозяев, представленных в изобретении.

Считают, что изобретение охватывает любые сконструированные клетки-хозяева, экспрессирующие полипептид, обладающий активностью GnTIII, включающий слитый полипептид, который содержит домен локализации в аппарате Гольджи гетерологичного полипептида, находящегося в аппарате Гольджи, как определено в данном контексте.

Одна или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, обладающий активностью GnTIII, может экспрессироваться под контролем конститутивного промотора или, альтернативно, регулируемой экспрессирующей системы. Данные системы хорошо известны в области техники и включают системы, обсуждаемые выше. Если ряд различных нуклеиновых кислот, кодирующих слитые полипептиды, обладающие активностью GnTIII и включающие домен локализации в аппарате Гольджи гетерологичного полипептида, находящегося в аппарате Гольджи, включены в систему клетки-хозяина, то некоторые из них могут экспрессироваться под контролем конститутивного промотора, тогда как другие экспрессируются под контролем регулируемого промотора. Уровни экспрессии слитых полипептидов,

обладающих активностью GnTIII, определяют методами, как правило, известными в области техники, включая анализ вестерн-блоттинг, анализ нозерн-блоттинг, анализ экспрессии сигнального гена или измерение активности GnTIII. Альтернативно можно использовать лектин, который связывается с продуктами биосинтеза GnTIII, например, лектин E4-PHA. Альтернативно можно использовать функциональный анализ, который измеряет повышенный уровень связывания Fc-рецептора или повышенную эффекторную функцию, опосредованную антителами, продуцируемыми клетками, сконструированными с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с активностью GnTIII.

Идентификация трансфектантов или трансформантов, которые экспрессируют белок, имеющий модифицированный тип гликозилирования

Клетки-хозяева, которые включают кодирующую последовательность химерной (например, гуманизированной) АСМ, обладающей в существенной степени такой же специфичностью связывания как крысиное антитело ICR62, и той, которая экспрессирует биологически активные продукты генов, можно идентифицировать посредством по меньшей мере четырех основных подходов: (а) гибридизации ДНК-ДНК или ДНК-РНК; (б) присутствия или отсутствия функций "маркерных" генов; (в) оценки уровня транскрипции, как измеряют по экспрессии соответственных транскриптор РНК в клетке-хозяине и (г) детекции продукта гена, как измеряют с помощью иммуноанализа или его биологической активности.

В первом подходе присутствие кодирующей последовательности химерной (например, гуманизированной) АСМ, обладающей в существенной степени такой же специфичностью связывания как крысиное антитело ICR62, и кодирующей последовательности полипептида, обладающего активностью GnTIII, можно определить посредством гибридизации ДНК-ДНК или ДНК-РНК при использовании зондов, включающих нуклеотидные последовательности, которые гомологичны соответствующим кодирующим последовательностям, соответственно, или их частям либо производным.

Во втором подходе рекомбинантный экспрессирующий вектор/система хозяина могут быть идентифицированы и отобраны на основе присутствия или отсутствия определенных функций "маркерного" гена (например, активности

5 тимидинкиназы, устойчивости к антибиотикам, устойчивости к метотрексату, трансформации фенотипа, формирования окклюзионных телец у бакуловируса и т.п.). Например, если кодирующая последовательность АСМ, представленная в изобретении, или ее фрагмент и кодирующая последовательность полипептида, обладающего активностью GnTIII, введены в последовательность маркерного гена вектора, рекомбинанты, включающие соответственные кодирующие последовательности, можно идентифицировать по отсутствию функции маркерного гена. Альтернативно маркерный ген можно поместить в тандеме с кодирующими последовательностями под контролем одного и того же или различных промоторов, используемых для контроля экспрессии кодирующих последовательностей. Экспрессия маркера в ответ на индукцию или отбор указывает на экспрессию кодирующей последовательности АСМ, представленной в изобретении, и кодирующей последовательности полипептида, обладающего активностью GnTIII.

25 В третьем подходе транскрипционная активность кодирующего участка АСМ, представленной в изобретении, или ее фрагмента и кодирующей последовательности полипептида, обладающего активностью GnTIII, можно оценить с помощью гибридизационных анализов. Например, РНК можно выделить и проанализировать нозерн-блотом с использованием зонда, гомологичного кодирующим последовательностям АСМ, представленным в изобретении, или их фрагментам и кодирующей последовательности полипептида, обладающего активностью GnTIII, или его определенным частям. Альтернативно общие нуклеиновые кислоты клетки-хозяина можно экстрагировать и оценить в плане гибридизации с данными зондами.

40 В четвертом подходе экспрессию белковых продуктов можно оценить иммунологически, например с помощью вестерн-блотов, иммуноанализов, таких как радиоиммунопреципитация, иммуноферментные анализы и т.п. Однако основной тест успеха экспрессирующей системы включает детекцию биологически активных продуктов гена.

45 Генерация и применение АСМ, имеющей повышенную эффекторную функцию, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность

В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение представляет гликоформы химерных (например, гуманизированных) АСМ,

обладающих в существенной степени такой же специфичностью связывания как крысиное антитело ICR62 и имеющих повышенную эффекторную функцию, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность. Ранее было описано конструирование гликозилирования антител. См., например, патент США No. 6602684, включенный в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте.

Клинические испытания неконъюгированных моноклональных антител (mAb), предназначенных для лечения некоторых видов рака, недавно показали обнадеживающие результаты. См. статьи Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997). Химерные неконъюгированные IgG1 одобрены для лечения низкодифференцированной или фолликулярной В-клеточной лимфомы не-Ходжкина. См. статью Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), тогда как другое неконъюгированное mAb, гуманизированное IgG1, направленное на солидные опухоли молочной железы, также показали обещающие результаты на фазе III клинических испытаний. См. статью Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997). Антигены данных двух mAb экспрессируются на высоком уровне в своих соответственных опухолевых клетках, и антитела опосредуют сильное разрушение опухоли эффекторными клетками *in vitro* и *in vivo*. Напротив, многие другие неконъюгированные mAbs с высокими опухолевыми специфичностями не могут инициировать эффекторные функции достаточной активности, чтобы они были клинически эффективными. См. статьи Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Для некоторых из данных менее активных mAbs в настоящее время тестируют возможность вспомогательного лечения цитокинами. Добавление цитокинов может стимулировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) путем повышения активности и числа циркулирующих лимфоцитов. См. статьи Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). ADCC, литическая атака в отношении клеток, на которые направлено антитело, инициируется при связывании рецепторов лейкоцитов с константной областью (Fc) антител. См. статью Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997).

Другой, но дополнительный подход к повышению активности ADCC неконъюгированных IgG1 состоит в конструировании Fc-участка антитела. Исследования конструирования белков показали, что FcγR взаимодействуют с

нижерасположенной шарнирной областью CH2-домена IgG. См. статью Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996). Однако связывание FcγR также требует присутствия олигосахаридов, ковалентно присоединенных к консервативному Asn 297 на участке CH2. См. статьи Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996); Wright и Morrison, Trends Biotech. 15:26-31 (1997), в которых предполагают, что либо оба, олигосахарид и полипептид, непосредственно входят в центр взаимодействия, либо что олигосахарид требуется для поддержания активной конформации CH2-полипептида. Вследствие этого модификацию структуры олигосахарида можно использовать как средство повышения аффинности взаимодействия.

На Fc-участке молекула IgG несет два N-связанных олигосахарида, по одному на каждой тяжелой цепи. Как любой гликопротеин, антитело получают как популяцию гликоформ, которые имеют одинаковый полипептидный каркас, но включают разные олигосахариды, присоединенные к центрам гликозилирования. Олигосахариды, обычно обнаруживаемые на Fc-участке сывороточного IgG, относятся к комплексному биантеннальному типу (см. статью Wormald et al., Biochemistry 36:130-38 (1997), с низким уровнем концевой сиаловой кислоты и раздвоением N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и вариабельной степенью концевой галактозилирования и фукозилирования ядра. Некоторые исследования позволяют предположить, что минимальная углеводная структура, необходимая для связывания FcγR, лежит в олигосахаридном ядре. См. статью Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996).

Клеточные линии, выделенные у мыши и китайского хомячка, используемые в промышленности и научных исследованиях для получения неконъюгированных терапевтических mAbs, в норме присоединяют требуемые олигосахаридные детерминанты к Fc-центрам. В IgG, экспрессирующихся в данных клеточных линиях, тем не менее отсутствуют раздвоенный GlcNAc, обнаруживаемый в низких количествах в сывороточных IgG. См. статью Lively et al., Glycobiology 318:813-22 (1995). Напротив, недавно обнаружено, что продуцируемое крысиной миеломой гуманизированное IgG1 (CAMPATH-1H) несет раздвоенный GlcNAc в некоторых из своих гликоформ. См. статью Lively et al., Glycobiology 318:813-22 (1995). Выделенное из крысиных клеток антитело достигало аналогичной максимальной активности ADCC *in vitro*, как антитела

САМРАТН-1Н, продуцируемые в стандартных клеточных линиях, но при существенно более низких концентрациях антитела.

Антиген САМРАТН обычно присутствует на высоких уровнях на клетках лимфомы, и данное химерное mAb обладает высокой активностью ADCC в отсутствие раздвоенного GlcNAc. См. статью Lively et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). В N-связанном пути гликозилирования раздвоенное GlcNAc вводят с помощью GnTIII. См. статью Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

В предшествующих исследованиях использовали продуцирующую одно антитело клеточную линию СНО, которая была ранее сконструирована для экспрессии регулируемым внешними факторами образом различных уровней клонированного фермента гена GnT III (см. статью Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Данный подход впервые устанавливал жесткую корреляцию между экспрессией GnTIII и активностью ADCC модифицированного антитела. Таким образом изобретение предусматривает рекомбинантное химерное антитело или его фрагмент со специфичностью связывания крысиного антитела ICR62, имеющего измененное гликозилирование, полученное в результате повышенной активности GnTIII. Повышенная активность GnTIII приводит в результате к повышению доли раздвоенных олигосахаридов, а также к снижению доли остатков фукозы на Fc-участке АСМ. Данное антитело или его фрагмент имеет повышенную аффинность связывания Fc-рецептора и повышенную эффекторную функцию. Кроме того, изобретение направлено на фрагмент антитела и слитые белки, включающие участок, который эквивалентен Fc-участку иммуноглобулинов. В предпочтительном варианте осуществления антитело является гуманизированным.

Терапевтические применения АСМ, полученных согласно способам, представленным в изобретении.

В самом широком смысле АСМ, представленные в настоящем изобретении, можно использовать *in vivo* или *in vitro* с клетками-мишенями, которые экспрессируют EGFR. Клетки, экспрессирующие EGFR, могут быть помечены для диагностических или терапевтических целей. В одном аспекте АСМ, представленные в настоящем изобретении, могут быть использованы для детекции присутствия EGFR в образце. В другом аспекте АСМ, представленные

в настоящем изобретении, могут быть использованы для ингибирования или снижения уровня EGFR-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках, экспрессирующих EGFR на поверхности. EGFR патологически экспрессируется (например, происходит сверхэкспрессия) во многих опухолях человека по сравнению с неопухолевой тканью того же типа клеток. Таким образом АСМ, представленные в изобретении, особенно эффективны в плане предупреждения образования опухолей, удаления опухолей и подавления роста опухолей. Посредством блокирования связывания лигандов EGFR с EGFR, АСМ, представленные в изобретении, ингибируют EGF-зависимую активацию опухолевых клеток, включая фосфорилирование тирозина EGFR, повышенный уровень внеклеточного подкисления и клеточной пролиферации. АСМ, представленные в изобретении, действуют также, останавливая клеточный цикл, вызывая апоптоз клеток-мишеней (например, опухолевых клеток) и ингибируя ангиогенез и/или дифференцировку клеток-мишеней. АСМ, представленные в изобретении, можно использовать для лечения любой опухоли, экспрессирующей EGFR. Конкретные злокачественные заболевания, которые можно лечить с помощью АСМ, представленных в изобретении, включают, но без ограничения перечисленным, карциномы эпидермальных и сквамозных клеток, немелкоклеточные карциномы легкого, глиомы, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак простаты, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи и карциномы почечных клеток.

АСМ, представленные в настоящем изобретении, можно использовать в виде монокомпонента для того, чтобы получать направленность и уничтожать опухолевые клетки *in vivo*. АСМ можно также использовать в сочетании с соответствующим терапевтическим агентом для лечения карциномы человека. Например, АСМ можно использовать в комбинации со стандартными или принятыми методами лечения, такими как химиотерапия, радиотерапия, или они могут быть конъюгированными или связанными с терапевтическим препаратом или токсином, а также с лимфокином или ингибирующим опухоль фактором роста для доставки терапевтического агента в область карциномы. Конъюгаты АСМ, представленные в данном изобретении, которые имеют первостепенную важность представляют собой (1) иммунотоксины (конъюгаты АСМ и цитотоксической группы) и (2) меченые (например имеющие радиоактивную

метку, меченные ферментом или меченные флуорохромом) АСМ, в которых метка обеспечивает средство идентификации иммунных комплексов, которые включают меченую АСМ. АСМ можно также использовать для индукции лизиса посредством процесса с участием естественного комплемента и для взаимодействия с антителозависимыми цитотоксическими клетками, которые обычно присутствуют.

Цитотоксическая группа иммунотоксина может представлять собой цитотоксический лекарственный препарат или ферментативно активный токсин бактериальной или растительной природы либо ферментативно активный фрагмент ("цепь") данного токсина. Используемые ферментативно активные токсины и их фрагменты представляют собой дифтерийную цепь А, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина А (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, α -сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, каротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин. В другом варианте осуществления АСМ конъюгированы с противоопухолевыми лекарственными препаратами в виде маленьких молекул. Конъюгаты АСМ и данных цитотоксических групп получают с использованием множества бифункциональных белковых связывающих агентов. Примерами данных реагентов являются SPDP, IT, бифункциональные производные имидозэфиров, такие как диметиладипимидат HCl, активные сложные эфиры, такие как дисукцинимидилсуберат, альдегиды, такие как глутаральдегид, бис-азидо-соединения, такие как бис-(*n*-азидобнзоил)гександиамин, бис-дiazониевые производные, такие как бис-(*n*-дiazонийбензоил)-этилендиамин, диизоцианаты, такие как толуол-2,6-диизоцианат и бис-соединения активного фтора, такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол. Лизирующая часть токсина может быть связана с фрагментом Fab АСМ. В области техники известны дополнительные подходящие токсины, как показано, например, в опубликованной патентной заявке США No. 2002/0128448, включенной в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления химерную (например, гуманизированную) гликоинженерную АСМ, имеющую в существенной степени такую же

специфичность связывания как крысиное антитело ICR62, конъюгируют с А-цепью рицина. Наиболее эффективно, когда А-цепь рицина дегликозилирована и
получена рекомбинантным путем. Эффективный метод получения
иммунотоксина рицина описан в статье Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987),
включенной в данном контексте в виде ссылки.

При использовании для уничтожения раковых клеток человека *in vitro* в
диагностических целях конъюгаты будут, как правило, вводить в среду для
культивирования клеток в концентрации по меньшей мере приблизительно 10
нМ. Состав и способ введения для применения *in vitro* не являются важными.
Как правило, будут использовать водные препараты, которые совместимы со
средой для культивирования или перфузии. Цитотоксичность можно прочесть
принятыми методами с целью определения присутствия или стадии развития
рака.

Как обсуждалось выше, цитотоксические радиофармацевтические
препараты для лечения рака можно получить путем конъюгирования
радиоактивного изотопа (например, I, Y, Pr) с химерной, гликоинженерной
АСМ, имеющей в существенной степени такую же специфичность связывания,
как крысиное антитело ICR62. Термин "цитотоксическая группа", как
используют в данном контексте, предусматривает включение данных изотопов.

В другом варианте осуществления липосомы наполняют цитотоксическим
лекарственным препаратом и покрывают липосомы АСМ, представленной в
настоящем изобретении. Поскольку на поверхности EGFR-экспрессирующей
злокачественной клетки находится много молекул EGFR, данный способ
обеспечивает доставку больших количеств лекарственного препарата к
заданному типу клеток.

Методики конъюгирования данных терапевтических агентов с антителами
хорошо известны (см., например, раздел Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for
Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" в монографии Monoclonal Antibodies
and Cancer Therapy под ред. Reisfeld et al., стр. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985);
раздел Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery" в монографии Controlled
Drug Delivery (2 изд.) под ред. Robinson et al., стр. 623-53 (Marcel Dekker, Inc.
1987); обзор Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A
Review", в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, под

ред. Pinchera et al., стр. 475-506 (1985) и статью Thorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Конъюгаты", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)).

Еще одни варианты терапевтического применения АСМ, представленной в изобретении, включают конъюгирование или связывание, например, с помощью технологий рекомбинантной ДНК, с ферментом, способным превращать пролекарственную форму в цитотоксическое лекарство, и использование данного конъюгата антитело-фермент в комбинации с пролекарственной формой для превращения пролекарственной формы в цитотоксический агент в области опухоли (см., например, статьи Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody -Alkaline Phosphatase Конъюгаты", Cancer Research 49:5789-5792 (1989) и Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Конъюгаты: A New Approach to Cancer Therapy," FASEB J. 4:188-193 (1990)).

Еще один вариант терапевтического применения АСМ, представленных в изобретении, включает использование либо неконъюгированных молекул в присутствии комплемента, либо их как части конъюгата антитело-лекарственный препарат или антитело-токсин для удаления опухолевых клеток из костного мозга онкологических больных. Согласно данному подходу аутологичный костный мозг можно очистить *ex vivo* обработкой антителом и ввести костный мозг инфузией обратно в организм пациента [см., например, статью Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", J. Clin. Immunol., 8(2):81-88 (1988)].

Более того, считают, что изобретение включает одноцепочечный иммунотоксин, включающий антигенсвязывающие домены, которые обеспечивают такую же специфичность связывания, как у крысиного антитела ICR62 (например, полипептиды, включающие CDR крысиного антитела ICR62) и, кроме того, включающие полипептид токсина. Одноцепочечные иммунотоксины, представленные в изобретении, можно использовать для лечения карциномы человека *in vivo*.

Аналогично слитый белок, включающий по меньшей мере антигенсвязывающий участок АСМ, представленной в изобретении, связанный с по меньшей мере функционально активной частью второго белка, обладающего
5 противоопухолевой активностью, например, лимфокина или онкостатина, можно использовать для лечения карциномы человека *in vivo*.

Настоящее изобретение представляет способ избирательного уничтожения
10 опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR. Данный способ включает реакцию иммуноконъюгата (например, иммунотоксина), представленного в изобретении, с указанными опухолевыми клетками. Данные опухолевые клетки могут быть
15 выделены из карциномы человека.

Кроме того, данное изобретение представляет способ лечения карцином (например, карцином человека) *in vivo*. Данный способ заключается во введении
20 пациенту фармацевтически эффективного количества композиции, включающей по меньшей мере один из иммуноконъюгатов (например, иммунотоксин), представленных в изобретении.

В следующем аспекте изобретение направлено на усовершенствованный
25 способ лечения нарушений пролиферации клеток, при которых экспрессируется EGFR, в частности, при которых происходит патологическая экспрессия EGFR (например, происходит сверхэкспрессия), включая рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легкого, молочной
30 железы, яичников, толстой кишки, простаты, кожи и почки, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества АСМ, представленной в настоящем изобретении, нуждающемуся в этом пациенту-человеку. В
35 предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой гликоинженерное антитело к EGFR со специфичностью связывания, в существенной степени такой же, как у крысиного антитела ICR62. В другом
40 предпочтительном варианте осуществления антитело является гуманизированным. Примеры нарушений пролиферации клеток, которые можно лечить с помощью АСМ, представленной в настоящем изобретении, включают, но без ограничения перечисленным, новообразования, находящиеся в: брюшной
45 полости, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечниках, парашитовидной железе, гипофизе, яичках, яичниках, тимусе, щитовидной
50

железе), глазах, голове и шее, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовых органах, коже, мягкой ткани, селезенке, торакальном отделе и мочеполовой системе.

Аналогичным образом другие нарушения пролиферации клеток можно также лечить АСМ, представленными в настоящем изобретении. Примеры данных нарушений пролиферации клеток включают, но без ограничения перечисленным: гипергаммаглобулинемию, лимфопролиферативные нарушения, парапротеинемии, пурпuru, саркоидоз, синдром Сезари, макроглобулинемия Вальденстрона, болезнь Гоше, гистиоцитоз и любую другую болезнь, связанную с пролиферацией клеток кроме новообразований, расположенных в системе органов, перечисленных выше.

В соответствии с практической реализацией данного изобретения пациент может являться человеком, лошадью, свиньей, крупным рогатым скотом, мышью, собакой, кошкой и птицей. В данное изобретение включает также других теплокровных животных.

Данное изобретение далее представляет способы ингибирования роста опухолевых клеток человека, лечения опухоли у пациента и лечения заболевания пролиферативного типа у пациента. Данные способы заключаются во введении пациенту эффективного количества композиции, представленной в изобретении.

Изобретение, кроме того, направлено на способы лечения незлокачественных заболеваний или нарушений у млекопитающих, характеризующихся патологической активацией или продукцией EGFR либо одного или более лигандов EGFR, заключающиеся во введении млекопитающему терапевтически эффективного количества АСМ, представленных в изобретении. У пациента будут, как правило, EGFR-экспрессирующие клетки, например, в его больной ткани, вследствие этого АСМ, представленные в изобретении, способны связываться с клетками в организме пациента.

Патологическая активация или экспрессия EGFR или лиганда EGFR может иметь место в клетках пациента, например, в больной ткани пациента.

Патологическую активацию EGFR можно приписать амплификации, сверхэкспрессии или aberrантной продукции EGFR и/или лиганда EGFR. В одном варианте осуществления изобретения будет проведен диагностический

или прогностический анализ с целью определения, имеет ли место у пациента патологическая продукция или активация EGFR (или лиганда EGFR). Например, можно определить амплификацию гена и/или сверхэкспрессию EGFR и/или лиганда. В области техники имеются различные анализы для определения данной амплификации/сверхэкспрессии, и они включают вышеописанные ИНС, FISH и анализ антигенов культуральной жидкости. Альтернативно или дополнительно согласно известным методам можно определить уровни лиганда EGFR, такого как TGF- α в образце или связанного с ним. Данные анализы могут определить белок и/или кодирующую его нуклеиновую кислоту в тестируемом образце. В одном варианте осуществления уровни лиганда EGFR в образце можно определить, используя иммуногистохимию (ИНС); см., например, статью Scher et al. Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995). Альтернативно или дополнительно можно оценить уровни кодирующей EGFR нуклеиновой кислоты в тестируемом образце; например посредством FISH, саузern-блоттинга или технологий ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Более того, сверхэкспрессию или амплификацию EGFR или лиганда EGFR можно оценить, используя диагностический анализ *in vivo*, например, путем введения молекулы (такой как антитело), которая связывает определяемую молекулу и помечена определяемой меткой (например, радиоактивным изотопом) и наружного сканирования пациента с целью локализации метки.

Альтернативно можно определить гетеродимеры EGFR, особенно гетеродимеры EGFR-ErbB2, EGFR-ErbB3 или EGFR-ErbB4, у пациента, например в его больной ткани, перед терапией. Имеются различные методы детекции нековалентных взаимодействий типа белок-белок или иных возможностей показать близость белков, представляющих интерес. Примеры методов детекции гетеродимеров EGFR включают без ограничения перечисленным, методы на основе иммуноаффинности, такие как иммунопреципитация; перенос энергии резонанса флуоресценции (FRET) (см. статьи Selvin, Nat. Struct. Biol. 7:730-34 (2000); Gadella & Jovin, J. Cell Biol. 129:1543-58 (1995) и Nagy et al., Cytometry 32:120-131 (1998)); солокализация EGFR либо с ErbB2, либо с ErbB3 с использованием стандартных прямых и косвенных методов иммунофлуоресценции и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии; визуализация путем лазерного сканирования (LSI)

для детекции связывания антитела и солокализации EGFR либо с ErbB2 либо с ErbB3 в высокоэффективном формате, таком как планшет для микротитрования (см. статью Zuck et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11122-11127 (1999)), или
5 система анализа eTag/m (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif. и патентную заявку США 2001/0049105, опубликованную 6 декабря 2001 г.).

Вследствие этого очевидно, что настоящее изобретение охватывает
10 фармацевтические композиции, комбинации и способы лечения злокачественных новообразований у человека, таких как рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легкого, молочной железы, яичников, толстой кишки, простаты, кожи и почки. Например, изобретение включает
15 фармацевтические композиции, предназначенные для применения при лечении злокачественных новообразований человека, включающие фармацевтически эффективное количество антитела, представленного в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Композиции АСМ, представленные в изобретении, можно вводить, используя принятые способы введения, включая, но без ограничения
25 перечисленным, внутривенное, внутрибрюшинное, пероральное, внутрилимфатическое или введение непосредственно в опухоль. Внутривенное введение является предпочтительным.

В одном аспекте изобретения терапевтические препараты, включающие
30 АСМ, представленные в изобретении, получают для хранения путем смешивания антитела, имеющего необходимую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или
35 стабилизаторами (см. справочник Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 изд., под ред. Osol, A. (1980)), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы нетоксичны
40 для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты, антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин, консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламминия, хлорид гексония, хлорид
45 бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол), низкомолекулярные (меньше чем
50

приблизительно 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, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

АСМ, представленные в настоящем изобретении, могут быть введены пациенту с целью лечения заболевания или нарушения, характеризующегося патологической активностью EGFR или лиганда EGFR, такого как опухоль, либо в виде монотерапии, либо в комбинации, например, с химиотерапевтическим агентом и/или радиотерапией. Примеры препаратов антитела к EGFR описаны в статье Herbst и Shen, Cancer 94(5):1593-1611. Подходящие химиотерапевтические агенты включают цисплатин, доксорубин, топотекан, паклитаксел, винбластин, цисплатин и этопозид.

Лиофилизированные препараты, адаптированные для подкожного введения описаны в WO 97/04801. Данные лиофилизированные препараты могут быть восстановлены подходящим разбавителем до высокой концентрации белка, и восстановленный препарат можно ввести подкожно млекопитающему, которого лечат в данном контексте.

Препарат в данном контексте может также включать больше чем одно активное соединение, как необходимо для конкретного показания, которое лечат, предпочтительно обладающих дополняющими активностями, которые не действуют друг на друга неблагоприятным образом. Например, может быть необходимым далее получить цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, цитокин или иммунодепрессант (например, действующий на Т-клетки, такой как циклоспорин или антитело, которое связывает Т-клетки, например, связывающий LFA-1). Эффективное количество данных других агентов зависит от количества антагониста, присутствующего в препарате, типа заболевания или нарушения или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их, как

правило, используют в тех же самых дозах и способах введения, как использовали выше, или приблизительно от 1 до 99% от использованных ранее доз.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или полимеризацией на границе фаз, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных препаратов (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Данные методики описаны в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences 16 изд., под ред. Osol, A. (1980).

Можно получить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антагонист, причем матрицы находятся в форме имеющих форму изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США No. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагающийся этилен-винилацетат, разлагающиеся сополимеры молочная кислота-гликолевая кислота, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочная кислота-гликолевая кислота и лейпролид ацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Препараты, предназначенные для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществляют фильтрованием через стерильные мембраны для фильтрования.

Композиции, представленные в изобретении, могут находиться в ряде дозированных форм, которые включают, но без ограничения перечисленным, жидкие растворы или суспензию, таблетки, пилюли, порошки, суппозитории, полимерные микрокапсулы или микроносители, липосомы и инъекционные или ин фузионные растворы. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения.

Композиции, представлены в изобретении, кроме того, предпочтительно включают принятые фармацевтически приемлемые носители и адъюванты, известные в области техники, такие как человеческий сывороточный альбумин, ионообменники, квасцы, лецитин, буферные субстанции, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия и соли или электролиты, такие как протаминсульфат.

Наиболее эффективный способ введения и схема дозирования для фармацевтических композиций, представленных в данном изобретении, зависит от тяжести и течения заболевания, состояния здоровья пациента и ответа на лечение и решения лечащего врача. В соответствии с этим дозы композиций следует определять для отдельного пациента. Тем не менее, эффективная доза композиций, представленных в данном изобретении, будет, как правило, лежать в интервале от приблизительно 0,01 до приблизительно 2000 мг/кг. В одном варианте осуществления эффективная доза лежит в интервале от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 15,0 мг/кг. В более специфическом варианте осуществления доза лежит в интервале от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг. В других вариантах осуществления доза лежит в интервале от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 4,5 мг/кг или от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг. Доза, представленная в настоящем изобретении, может также являться любой дозой в данных интервалах, включая, но без ограничения перечисленным, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг, 10,0 мг/кг, 10,5 мг/кг, 11,0 мг/кг, 11,5 мг/кг, 12,0 мг/кг, 12,5 мг/кг, 13,0 мг/кг, 13,5 мг/кг, 14,0 мг/кг, 14,5 мг/кг или 15,0 мг/кг.

Молекулы, описанные в данном контексте, могут находиться в ряде дозированных форм, которые включают, но без ограничения перечисленным, жидкие растворы или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, суппозитории, полимерные микрокапсулы или микроносители, липосомы или инъекционные либо инфузионные растворы. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения.

Дозы, представленные в настоящем изобретении, можно в ряде случаев определить с использованием предсказательных биомаркеров. Предсказательные

биомаркеры представляют собой молекулярные маркеры, которые используют для определения (т.е. визуального и/или количественного) характера экспрессии и/или активации связанных с опухолью генов или белков либо клеточных компонентов пути передачи сигнала, связанного с опухолью. Объяснение биологических эффектов направленных терапевтических препаратов в опухолевой ткани и корреляция данных эффектов с клиническим ответом помогает идентифицировать превалирующие пути роста и выживаемости, функциональные в опухолях, устанавливая, таким образом, профиль вероятных отвечающих пациентов и, напротив, получения рационального пути разработки стратегий преодоления устойчивости. Например, биомаркеры для терапии антителами к EGFR могут включать молекулы, которые находятся ниже EGFR в пути передачи сигнала, который приводит к нарушению пролиферации клеток, в том числе, но без ограничения перечисленным, Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 (см. статьи Mitchell, Nature Biotech. 22: 363-364 (2004); Becker, Nature Biotech 22:15-18 (2004); Tsao и Herbst, Signal 4:4-9 (2003)). Биомаркеры для терапии антителами к EGFR могут также включать рецепторы фактора роста, такие как EGFR, ErbB-2 (HER2/neu) и ErbB-3 (HER3) и могут являться положительными или отрицательными предсказательными факторами ответа пациента на терапию антителами к EGFR. Например, рецептор фактора роста ErbB-3 (HER3), как определяют, представляет собой отрицательный предсказательный биомаркер для антитела к EGFR ABX-EGF (опубликованная патентная заявка США No. 2004/0132097 A1).

Предсказательные биомаркеры можно измерить с помощью клеточных анализов, которые хорошо известны в области техники, включая, но без ограничения перечисленным иммуногистохимию, проточную цитометрию, иммунофлуоресценцию, анализы на основе захвата и детекции и анализы с обращенной фазой, приведенные в опубликованной патентной заявке США No. 2004/0132097 A1, полное содержание которой включено в данном контексте в виде ссылки. Сами предсказательные биомаркеры для терапии антителами к EGFR можно идентифицировать согласно методам, приведенным в опубликованной патентной заявке США No. 2003/0190689A1, полное содержание которой включено в данном контексте в виде ссылки.

В одном аспекте настоящее изобретение представляет способ лечения связанного с EGFR нарушения, заключающийся в предсказании ответа на терапию антителами к EGFR у пациента-человека, нуждающегося в лечении, путем анализа образца, полученного от пациента-человека, перед лечением с помощью одного или множества реагентов, которые определяют экспрессию и/или активацию предсказательных биомаркеров для связанного с EGFR нарушения, такого как рак, определении типа экспрессии и/или активации одного или более предсказательных биомаркеров, причем тип предсказывает ответ пациента-человека на терапию антителами к EGFR, и введение пациенту-человеку, который, как предсказывают, положительно реагирует на лечение антителами к EGFR, терапевтически эффективного количества композиции, включающей АСМ, представленную в настоящем изобретении. Как используют в данном контексте, пациент-человек, который, как предсказывают, положительно реагирует на лечение антителами к EGFR, является тем, у которого антитело к EGFR будет иметь измеряемый эффект на связанное с EGFR нарушение (например, регрессия/уменьшение опухоли) и для которого благоприятные эффекты терапии антителами к EGFR не перевешиваются неблагоприятными эффектами (например, токсичностью). Как используют в данном контексте, образец означает любой биологический образец, полученный из организма, в частности, организма человека, включающий одну или более клеток, в том числе отдельные клетки любой природы, образцы ткани или биоптата, которые удалены из органов, таких как молочная железа, легкое, желудочно-кишечный тракт, кожа, шейка матки, яичник, простата, почка, головной мозг, голова и шея или любой другой орган или ткань тела и другие образцы тела, включая, но без ограничения перечисленным, мазки, мокрота, выделения, спинно-мозговая жидкость, желчь, кровь, лимфатическая жидкость, моча и кал.

Композицию, включающую АСМ, представленную в настоящем изобретении, будут получать, дозировать и вводить способом, соответствующим международным требованиям к ведению лечебного процесса. Факторы, принимаемые во внимание в данном контексте, включают конкретное заболевание или нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, течение

заболевания или нарушения, область доставки агента, способ введения, схема введения и другие факторы, известные лечащим врачам. Терапевтически эффективное количество вводимого антагониста определяется данными факторами.

В качестве общей нормы терапевтически эффективное количество антитела, вводимого парентерально/дозу будет лежать в интервале от приблизительно 0,1 до 20 мг/кг массы тела пациента в сутки, причем типичный исходный интервал используемого антагониста лежит в интервале от приблизительно 2 до 10 мг/кг. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество лежит в интервале от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 15,0 мг/кг. В более конкретном варианте осуществления доза лежит в интервале от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг. В других вариантах осуществления доза лежит в интервале от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 4,5 мг/кг или от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг. Доза, предусмотренная настоящим изобретением, может также представлять собой любую дозу, лежащую в данных интервалах, включая, но без ограничения перечисленным, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг, 10,0 мг/кг, 10,5 мг/кг, 11,0 мг/кг, 11,5 мг/кг, 12,0 мг/кг, 12,5 мг/кг, 13,0 мг/кг, 13,5 мг/кг, 14,0 мг/кг, 14,5 мг/кг или 15,0 мг/кг.

В предпочтительном варианте осуществления АСМ представляет собой антитело, предпочтительно гуманизированное антитело. Подходящие дозы для данных неконъюгированных антител лежат, например, в интервале от приблизительно 20 мг/м² до приблизительно 1000 мг/м². Например, можно ввести пациенту одну или более доз значительно более низких чем 375 мг/м² антитела, например, когда доза лежит в интервале от приблизительно 20 мг/м² до приблизительно 250 мг/м², например от приблизительно 50 мг/м² до приблизительно 200 мг/м².

Более того, можно ввести одну или более исходных доз антитела, а затем одну или более последующих доз, причем количество мг/м² дозы антитела в последующей дозе(ах) превосходит количество мг/м² дозы антитела в исходной

дозе(ах). Например, исходная доза может лежать в интервале от приблизительно 20 мг/м² до приблизительно 250 мг/м² (например, от приблизительно 50 мг/м² до приблизительно 200мг/м²) и последующая доза может лежать в интервале от приблизительно 250 мг/м² до приблизительно 1000 мг/м².

Однако, как отмечено выше, данные предлагаемые количества АСМ являются в значительной степени объектом терапевтического выбора. Ключевым фактором в выборе подходящей дозы и схемы лечения является полученный результат, как указано выше. Например, для лечения хронических и острых заболеваний изначально могут потребоваться относительно более высокие дозы. Для получения более эффективных результатов в зависимости от заболевания или нарушений антагонист вводят настолько возможно быстрее после первого признака, диагноза, появления или эпизода заболевания или нарушения или во время ремиссий заболевания или нарушения.

В случае использования антител к EGFR для лечения опухолей оптимальных терапевтических результатов, как правило, достигают при дозе, которая достаточна для полного насыщения рецепторов EGF на клетках-мишенях. Доза, необходимая для достижения насыщения будет зависеть от числа экспрессируемых рецепторов EGF/опухолевую клетку (которое может значительно варьировать среди разных типов опухолей). Сывороточные концентрации, настолько низкие как 30 нМ, эффективны при лечении ряда опухолей, тогда как концентрации выше 100 нМ могут быть необходимы для достижения оптимального терапевтического эффекта с другими опухолями. Дозу, необходимую для достижения насыщения для данной опухоли можно легко определить *in vitro* с помощью радиоиммуноанализа или иммунопреципитации.

Как правило, для комбинированной терапии с облучением одна из подходящих терапевтических схем включает восьминедельные инфузии АСМ к EGFR, представленную в изобретении, в ударной дозе 100-500 мг/м² с последующими поддерживающими дозами 100-250 мг/м² и облучением в количестве 70,0 Гр в дозе 2,0 Гр ежедневно. Для комбинированной терапии с химиотерапией одна из подходящих терапевтических схем включает введение АСМ к EGFR, представленной в изобретении, как ударной/поддерживающей доз

еженедельно $100/100 \text{ мг/м}^2$, $400/250 \text{ мг/м}^2$ или $500/250 \text{ мг/м}^2$ в комбинации с
цисплатином в дозе 100 мг/м^2 каждые три недели. Альтернативно вместо
5 цисплатина можно использовать гемцитабин или иринотекан.

АСМ, представленную в настоящем изобретении, вводят любыми
подходящими путями, включая парентеральный, подкожный,
внутрибрюшинный, внутрилегочный и интраназальный, и, при необходимости
10 используют для местного иммунодепрессивного лечения, введения в область
поражения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное,
внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение.
15 Кроме того, антагонист может быть соответствующим образом введен
импульсной инфузией, например, при снижающихся дозах антагониста.
Предпочтительно, когда дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее
предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций отчасти в
20 зависимости от того, является ли введение кратким или постоянным.

Можно ввести с антагонистами в данном контексте другие соединения,
такие как цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты,
25 иммунодепрессанты и/или цитокины. Комбинированное введение включает
совместное введение с использованием отдельных препаратов или одного
фармацевтического препарата и последовательное введение в любом порядке,
30 причем предпочтительно, когда имеется период времени, в который оба (или
все) активные агенты одновременно проявляют свою биологическую активность.

Было бы ясно, что доза композиции, представленной в изобретении,
35 необходимая для достижения лечебного эффекта, может быть далее снижена при
оптимизации схемы лечения.

Согласно практической реализации изобретения фармацевтический
носитель может представлять собой липидный носитель. Липидный носитель
40 может представлять собой фосфолипид. К тому же липидный носитель может
представлять собой жирную кислоту. Кроме того, липидный носитель может
являться детергентом. Как используют в данном контексте, детергент
представляет собой любую субстанцию, которая изменяет поверхностное
45 натяжение жидкости, как правило, уменьшая его.

В одном примере изобретения детергент может представлять собой
неионогенный детергент. Примеры неионогенных детергентов включают, но без
50

ограничения перечисленным, полисорбат 80 (известный также как Tween 80 или (полиоксиэтиленсорбит моноолеат), Brij и Triton (например Triton WR-1339 и Triton A-20).

Альтернативно детергент может представлять собой ионогенный детергент. Пример ионогенного детергента включает, но без ограничения перечисленным, алкилтриметиламмонийбромид.

Кроме того, согласно изобретению, липидный носитель может являться липосомой. Как используют в данной заявке, "липосома" представляет собой любой связанный с мембраной носитель, который включает любые молекулы, представленные в изобретении, или их комбинации.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к АСМ, соответствующим настоящему изобретению, предназначенным для применения в качестве лекарственного препарата, в частности, для применения для лечения или профилактики рака или для применения при предраковом состоянии или поражении. Рак может представлять собой, например, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), рак бронхоальвеолярных клеток легкого, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, кожная или внутриглазная меланома, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочной области, рак толстой кишки, рак молочной железы, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному вагины, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечных клеток, карциному почечной лоханки, мезотелиому, гепатоцеллюлярный рак, рак желчных протоков, хронический или острый лейкоз, лимфолимфомы, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), опухоли позвоночника, глиому ствола головного мозга, мультиформную глиобластому, астроцитомы, шванномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, карциномы сквамозных клеток, аденомы гипофиза, включая устойчивые варианты любой из вышеперечисленных форм рака или комбинацию одной или более вышеперечисленных форм рака. Предраковое состояние или поражения

включает, например, группу, состоящую из лейкоплакии полости рта, старческого кератоза (лучевого кератоза), предраковых полипов толстой или прямой кишки, эпителиальной дисплазии желудка, аденоматозной дисплазии, синдрома наследственного неполипозного рака толстой кишки (HNPCC), эзофагита Баррета, дисплазии мочевого пузыря и предраковых состояний шейки матки.

Предпочтительно, когда указанная форма рака выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, рака кожи, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака яичников, рака толстой кишки, рака простаты, рака почки и рака головного мозга.

Еще один вариант осуществления представляет собой применение АСМ, представленной в настоящем изобретении, для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики рака. Форма рака, как определено выше.

Предпочтительно, когда указанная форма рака выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, рака кожи, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака яичников, рака толстой кишки, рака простаты, рака почки и рака головного мозга.

Кроме того, предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

Кроме того, более предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг.

Кроме того, более предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно до приблизительно 4,5 мг/кг.

Кроме того, более предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг.

Наиболее предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве приблизительно 1,5 мг/кг.

Кроме того, наиболее предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве приблизительно 4,5 мг/кг.

Кроме того, наиболее предпочтительно, когда указанную антигенсвязывающую молекулу используют в терапевтически эффективном количестве приблизительно 12 мг/кг.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения связанного с EGFR нарушения у млекопитающего, нуждающегося в данном лечении, заключающийся во введении млекопитающему АСМ, представленной в настоящем изобретении, причем лечение дает в результате сывороточные концентрации указанной АСМ от приблизительно 1 до приблизительно 500 мкг/мл в течение по меньшей мере 4 недель, и при этом лечение не вызывает клинически важный уровень токсичности у данного млекопитающего. В других вариантах осуществления сывороточная концентрация является количеством, выбранным из группы, состоящей из более 1 мкг/мл, более 25 мкг/мл, более 50 мкг/мл, более 100 мкг/мл, более 200 мкг/мл, более 300 мкг/мл, более 400 мкг/мл, более 500 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 100 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 200 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 300 мкг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 400 мкг/мл и от приблизительно 1 до приблизительно 500 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления млекопитающее является человеком. В одном варианте осуществления АСМ является антителом. В предпочтительном варианте осуществления антитело является гликоинженерным и имеет повышенный уровень связывания FcγRIII по сравнению с негликоинженерной формой антитела.

Изделия

В другом варианте осуществления изобретения представлено изделие, включающее материалы, используемые для лечения вышеописанных нарушений. Изделие включает контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или связанную с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылочки, флаконы, шприцы и т.п. Контейнеры могут быть выполнены из ряда материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая эффективна при лечении состояния и может иметь стерильное входное отверстие

(например, контейнер может представлять собой упаковку с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокалываемую гиподермической инъекционной иглой). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело к EGFR. На этикетке или вкладыше в упаковку указывают, что композицию используют для лечения выбранного состояния, такого как незлокачественное заболевание или нарушения, причем заболевание или нарушение включает патологическую активацию или образование рецептора EGFR и/или лиганда EGFR, например, доброкачественное гиперпролиферативное заболевание или нарушение. Более того, изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция включает первое антитело, которое связывает EGFR и ингибирует рост клеток, которые осуществляют сверхэкспрессию EGFR и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция включает второе антитело, которое связывает EGFR и блокирует активацию лиганда рецептора EGFR. Изделие в данном варианте осуществления изобретения может, кроме того, включать вкладыш в упаковку, на котором указывают, что композиции первого и второго антитела можно использовать для лечения незлокачественного заболевания или нарушения из перечня данных заболеваний или нарушений в вышеприведенном разделе определений. Более того, вкладыш в упаковку может инструктировать пользователя композиции (включающей антитело, которое связывает EGFR и блокирует активацию лиганда рецептора EGFR), сочетать терапию антителом и любое из вспомогательных терапевтических лечений, описанных в предшествующем разделе (например, химиотерапевтический агент, лекарственный препарата, направленный на EGFR, антиангиогенный агент, иммунодепрессант, ингибитор тирозинкиназы, антигормональное соединение, кардиопротектор и/или цитокин). Альтернативно или дополнительно изделие может, кроме того, включать второй (или третий) контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом солевой раствор и раствор декстрозы. Она может далее включать другие материалы, приемлемые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Нижеприведенные примеры объясняют изобретение более детально. Следующие препараты и примеры даны, чтобы предоставить возможность более ясного понимания и практической реализации настоящего изобретения компетентным специалистам в области техники. Однако настоящее изобретение не ограничено объемом иллюстративных вариантов осуществления, которые предназначены только для иллюстрации отдельных аспектов изобретения, и способы, которые являются функционально эквивалентными, входят в объем изобретения. В действительности различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном контексте, будут очевидны компетентным специалистам в области техники из предшествующего описания и сопровождающих чертежей. Предусматривают, что данные модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все патенты, заявки и публикации, приведенные в данной заявке, тем самым включены в виде ссылки во всей своей полноте.

Примеры

Пока не определено иначе, ссылки на нумерацию специфических положений остатков аминокислот в следующих примерах соответствуют системе нумерации Kabat. Пока не указано иначе, материалы и способы, используемые для получения антител, описанных в данных рабочих примерах, согласуются с приведенными в примерах патентной заявки США No. 10/981738, которая в данном контексте включено в виде ссылки во всей своей полноте.

Пример 1

Материалы и способы

Подход с использованием акцептора с высоким уровнем гомологии

Поиск каркаса акцептора антитела с высокой гомологией осуществляют путем элайнмента последовательности белка крысиного ICR62 с коллекцией человеческих последовательностей зародышевой линии и выбора такой человеческой последовательности, которая показывает самую высокую идентичность последовательности при сохранении всех канонических остатков на функциональном уровне. В данном случае последовательность 1-е из семейства VH1 базы данных VBase выбирают в качестве акцепторной последовательности каркаса тяжелой цепи, и последовательность A30 из семейства VK1 базы данных VBase выбирают в качестве акцептора каркаса для

легкой цепи. На данные два акцепторных каркаса прививают три участка, определяющих комплементарность (CDR), и/или остатки, определяющие специфичность данных CDR тяжелого и легкого переменных доменов крысиного ICR62. Поскольку каркасный участок 4 не является частью переменной области гена зародышевой линии, элайнмент для данного положения проводят индивидуально. Для тяжелой цепи выбирают участок JH6 и для легкой цепи выбирают участок JK2. Молекулярное моделирование сконструированного домена иммуноглобулина показывает наличие одного положения вне CDR1 Kabat, потенциально требующего мышиных остатков аминокислот вместо человеческих вне CDR. Реинтродукция мышиных остатков аминокислот в человеческий каркас привела бы к генерации так называемых "обратных мутаций". Например, человеческий акцепторный остаток аминокислоты в положении 27 по Kabat (глицин в 1-е) переводят обратной мутацией в остаток тирозина. Для того, чтобы показать важность остатков для связывания антигена, создают варианты гуманизированного антитела, которые либо включают, либо не включают обратные мутации. Легкая цепь гуманизированного антитела не требует каких-либо обратных мутаций. После конструирования последовательности белка синтезируют последовательности ДНК, кодирующие данные белки, как детально описано ниже.

Подход с использованием смешанного каркаса

Чтобы избежать необходимости интродукции обратных мутаций в важных положениях (важных для сохранения высокой аффинности связывания антигена или функций антитела) человеческого акцепторного каркаса, исследуют, можно ли заменить каркасный участок 1 (FR1), каркасные участки 1 (FR1) и 2 (FR2) вместе или каркасный участок 3 (FR3) функционально гуманизированного антитела последовательностями человеческого антитела, уже имеющими донорные остатки или остатки аминокислот, которые функционально эквивалентны донорным остаткам, в положениях остатков в последовательности природной человеческой зародышевой линии. Для этой цели каркасные участки VH 1, 2 и 3 последовательности VH крысиного ICR62 индивидуально выравнивают с последовательностями человеческой зародышевой линии. В данном случае самую высокую идентичность последовательности не используют при выборе акцепторных каркасов; вместо этого проводят спаривание ряда

важных остатков. Данные важные остатки включают так называемые канонические остатки, а также те остатки в положении 27, 28 и 30 (по нумерации Kabat), которые лежат вне определения CDR1 по Kabat, но часто участвующие в связывании антигена. Кроме того, важные остатки представляют собой остатки, демонстрирующие важное взаимодействие с CDR, как можно определить с использованием молекулярного моделирования. Последовательность IMGT IGHV1-58 (регистр. No. M29809), IGHV5-51 (регистр. No. M99686), а также последовательность VBase 1-02 из семейства VH1 выбирают как подходящие для замены одной из FR1, 2 или 3. Вкратце: IGHV1-58 демонстрирует перспективный тип в положениях Kabat 27-30, не соответствует критериям канонического положения 71. IGHV5-51 имеет спаривающийся остаток 71, поэтому ее FR3 может быть использован. Кроме того, ее FR1 близка к требующейся последовательности FR1.

1-е VH1 соответствует всем критериям кроме положения 27. Полагают, что последовательность 1-02 приемлема по участкам FR1 и FR2, но ей бы потребовалась обратная мутация в FR3.

После конструирования последовательностей белка синтезируют последовательности ДНК, кодирующей данные белки, как детально описано ниже. При использовании данного подхода обратные мутации не являются необходимыми в большинстве конструкций тяжелой цепи для сохранения высоких уровней связывания антигена. Хронологию и выводы относительно смешанных каркасных конструкций объясняют в разделе результаты.

Синтез генов антитела

После конструирования последовательности аминокислот V-области гуманизированного антитела генерируют последовательность ДНК. Данные по последовательности ДНК отдельных каркасных участков находят в базах данных (например IMGT или VBase) для человеческих последовательностей зародышевой линии. Информацию о последовательностях ДНК CDR-участков получают из опубликованной последовательности крысиного антитела ICR62 (см., например, публикацию PCT WO 95/20045). С помощью данных последовательностей фактически собирают целую последовательность ДНК. Располагая данными об этой последовательности ДНК, в возможную последовательность интродуцируют диагностические сайты рестрикции

посредством введения молчащих мутаций, создавая сайты распознавания для рестрикционных эндонуклеаз.

Для получения физической цепи ДНК осуществляют синтез гена (см., например, статью Wheeler et al. 1995). В данном способе олигонуклеотиды конструируют из генов, представляющих интерес, при этом серию олигонуклеотидов выделяют из кодирующей нити и другую серию – из некодирующей нити. 3'- и 5'-концы каждого олигонуклеотида (за исключением самого первого и последнего в ряду) всегда показывают комплементарные последовательности в отношении двух праймеров, выделенных из противоположной нити. При помещении данных олигонуклеотидов в реакционный буфер, приемлемый для любой термостабильной полимеразы, и добавлении Mg^{2+} , дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфатов) и ДНК-полимеразы каждый олигонуклеотид удлиняется с 3'-конца. Затем заново образованный 3'-конец праймера отжигают со следующим праймером противоположной нити и удлиняют его последовательность дальше в условиях, подходящих для матрица-зависимой элонгации цепи ДНК. Конечный продукт клонируют в принятый вектор для размножения в *E. coli*.

Образование антител

Для конструирования экспрессирующих векторов для химерных (т.е. полностью крысиная V-область и человеческая C-область) и гуманизированных легкой и тяжелой цепей анти-EGFR вводят лидерные последовательности человеческой тяжелой и легкой цепей (для секреции) выше по ходу транскрипции последовательности ДНК варибельной области. Ниже варибельных областей по ходу транскрипции вводят константные области IgG1 для тяжелой цепи и к-константной области для легкой цепи с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Полученные в результате последовательности ДНК тяжелой и легкой цепей полного антитела субклонируют в экспрессирующие векторы млекопитающих (одну для легкой цепи и одну для тяжелой цепи) под контролем промотора MPSV и по ходу транскрипции перед синтетическим сайтом polyA, причем каждый вектор несет последовательность OriP EBV (вируса Эпштейна-Барр).

Антитела получают путем сотрансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессирующими векторами тяжелой и легкой цепей антитела

млекопитающих, используя подход на основе трансфекции с помощью фосфата кальция. Экспоненциально растущие клетки НЕК293-EBNA трансфицируют методом с использованием фосфата кальция. Для получения немодифицированного антитела клетки трансфицируют только экспрессирующими векторами тяжелой и легкой цепей антитела в соотношении 1:1. Для получения гликоинженерного антитела клетки сотрансфицируют четырьмя плазмидами, двумя - для экспрессии антитела, одной - для экспрессии слитого полипептида GnTIII и одной – для экспрессии маннозидазы II в соотношении 4:4:1:1, соответственно. Клетки выращивают в виде адгезивных однослойных культур в Т-образных колбах при использовании среды для культивирования DMEM с добавлением 10% FCS (сыворотки телячьих эмбрионов) и трансфицируют, когда они достигают 50-80% конфлюэнтности. Для трансфекции колбу T75 засевают 8 млн. клеток за 24 часа до трансфекции в 14 мл среды для культивирования DMEM с добавлением FCS (до 10% об./конечный об.), 250 мкг/мл неомидина и помещают клетки в термостат при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение ночи. Для того, чтобы трансфицировать каждую колбу T75, получают раствор ДНК, CaCl₂ и воды, смешивая 47 мкг общей плазмидной векторной ДНК, разделенной поровну между экспрессирующими векторами легкой и тяжелой цепей, 235 мкл 1М раствора CaCl₂ и добавляя воду до конечного объема 469 мкл. К данному раствору добавляют раствор 469 мкл 50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ Na₂HPO₄ при pH 7,05, сразу перемешивают в течение 10 сек. и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 20 сек. Суспензию разводят 12 мл DMEM с добавлением 2% FCS и вносят в T75 вместо имеющейся среды. Клетки инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение приблизительно 17-20 часов, затем среду заменяют 12 мл DMEM, 10% FCS. Кондиционированную среду для культивирования собирают через 5-7 дней после трансфекции путем центрифугирования в течение 5 мин. при 1200 об./мин. с последующим вторым центрифугированием в течение 10 минут при 4000 об./мин. и сохраняют при 4°C.

Секретируемые антитела очищают аффинной хроматографией с использованием белка А с последующей катионообменной хроматографией и конечной стадией эксклюзионной хроматографии по размеру на колонке

Superdex 200 (Amersham Pharmacia), заменяя буфер соевым раствором, забуференный фосфатом, и собирая очищенные мономерные антитела IgG1. Концентрацию антител оценивают, используя спектрофотометр при поглощении 280 нм. Антитела получают в растворе 25 мМ фосфата калия, 125 мМ хлорида натрия, 100 мМ глицина при pH 6,7.

Гликоинженерные варианты гуманизированного антитела получают путем сотрансфекции векторов, экспрессирующих антитело, вместе с вектором, экспрессирующим гликозилтрансферазу GnT-III или вместе с вектором, экспрессирующим гликозилтрансферазу GnT-III и вектором, экспрессирующим маннозидазу II аппарата Гольджи. Гликоинженерные антитела очищают и получают, как описано выше для негликоинженерных антител. Олигосахариды, присоединенные к Fc-участку антител, анализируют с помощью MALDI/TOF-MS, как описано ниже.

Анализ олигосахаридов

Олигосахариды с помощью ферментов высвобождают из антител путем разложения PNGазой F, причем антитела либо иммобилизованы на мембране PVDF, либо находятся в растворе.

Полученный в результате разложения раствор, включающий высвободившиеся олигосахариды либо готовят непосредственно для анализа MALDI/TOF-MS, либо подвергают дальнейшему разложению гликозидазой EndoH перед получением образца для анализа MALDI/TOF-MS.

Способ высвобождения олигосахаридов для антител, иммобилизованных на мембране PVDF

Лунки 96-луночного планшета, сделанные из мембраны PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts), смачивают 100 мкл метанола и жидкость проводят через мембрану PVDF, используя вакуум, подаваемый к вакуумной подводке Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Мембраны PVDF трижды промывают 300 мкл воды. Затем лунки промывают 50 мкл буфера RCM (8 М мочевины, 360 мМ Трис, 3,2 мМ ЭДТА, pH 8,6). От 30 до 40 мкг антитела вносят в лунку, содержащую 10 мкл буфера RCM. Жидкость в лунке проводят через мембрану, используя вакуум, и затем мембрану дважды промывают 50 мкл буфера RCM. Восстановление дисульфидных мостиков осуществляют

добавлением 50 мкл 0,1 М дитиотрейтола в RCM и инкубированием при 37°C в течение 1 часа.

После восстановления используют вакуум для удаления раствора дитиотрейтола из лунки. Лунки трижды промывают 300 мкл воды перед проведением карбоксиметилирования остатков цистеина добавлением 50 мкл 0,1 М иодуксусной кислоты в буфере RCM и инкубированием при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут.

После карбоксиметилирования лунки протягивают вакуумом и затем три раза промывают 300 мкл воды. Затем мембрану PVDF блокируют, чтобы предупредить адсорбцию эндогликозидазы, инкубированием 100 мкл 1% водного раствора поливинилпирролидона 360 при комнатной температуре в течение 1 часа. Блокирующий агент затем удаляют под легким вакуумом с последующими тремя промываниями 300 мкл воды.

N-связанные олигосахариды высвобождают добавлением 2,5 мЕд. пептид-N-гликозидазы F (рекомбинантная N-Гликаназа, GLYKO, Novato, CA) и 0,1 мЕд. сиалидазы (GLYKO, Novato, CA) для удаления любых потенциальных заряженных остатков моносахаридов в конечном объеме 25 мкл в 20 мМ NaHCO₃, pH 7,0). Разложение осуществляют в течение 3 часов при 37°C.

Способ высвобождения олигосахаридов для антител в растворе

От 40 до 50 мкг антитела смешивают с 2,5 мЕд. PNGазы F (Glyko, США) в 2 мМ Трис, pH 7,0 в конечном объеме 25 мкл и инкубируют смесь в течение 3 часов при 37°C.

Использование разложения эндогликозидазы Н высвобожденных с помощью PNGазой F олигосахаридов для распределения гибридных раздвоенных олигосахаридных структур относительно пиков нейтральных олигосахаридов MALDI/TOF-MS

Затем высвобожденные с помощью PNGазы F олигосахариды разлагают с помощью эндогликозидазы Н (EC 3.2.1.96). Для EndoH разложения 15 мЕд. EndoH (Roche, Швейцария) добавляют к продукту разложения PNGазой F (вышеописанный способ для антитела в растворе), получая конечный объем 30 мкл, и инкубируют смесь в течение 3 часов при 37°C. EndoH расщепляет цепь между остатками N-ацетилглюкозамина хитобиозного ядра N-связанных олигосахаридов. Фермент может расщеплять только олигоманнозу и

большинство гликанов гибридного типа, тогда как олигосахариды комплексного типа на гидролизуются.

Получение образца для MALDI/TOF-MS

Продукты ферментного разложения, включающие высвободившиеся олигосахариды, инкубируют в течение дополнительных 3 часов при комнатной температуре после добавления уксусной кислоты до конечной концентрации 150 мМ и затем пропускают через 0,6 мл катионообменной смолы (смола AG50W-X8, водородная форма, 100-200 меш, BioRad, Швейцария), упакованной в хроматографическую колонку micro-bio-spin (BioRad, Швейцария) для удаления катионов и белков. Один мкл полученного в результате образца наносят на предметную пластину из нержавеющей стали и смешивают на пластине в 1 мкл матрицы sDHB. Матрицу sDHB получают, растворяя 2 мг 2,5-дигидробензойной кислоты с добавлением 0,1 мг 5-метоксисалициловой кислоты в 1 мл этанола/10 мМ водного хлорида натрия 1:1 (v/v). Образцы сушат на воздухе, наносят 0,2 мкл этанолом и в конце образцам дают возможность перекристаллизоваться на воздухе.

MALDI/TOF-MS

Масс-спектрометр MALDI-TOF, используемый для получения масс-спектров, представляет собой Voyager Elite (Perspective Biosystems). Прибор используют в линейной конфигурации с ускорением 20 кВ и задержке 80 нсек. Для определения массы ионов используют внешнюю калибровку с использованием стандартов олигосахаридов. Спектры от 200 лазерных импульсов суммируют для получения конечного спектра.

Анализ связывания антигена

Очищенные мономерные гуманизированные варианты антитела тестируют на связывание с рецептором человеческого эпидермального фактора роста (EGFR, называемого также в литературе HER-1 или ErbB1) на линии эпидермальных клеток человека A431, используя анализ на основе проточной цитометрии. 200000 клеток (например, человеческой клеточной линии A431) в 180 мкл буфера FACS (PBS, включающий 2% FCS и 5 мМ ЭДТА) переносят в полистироловые пробирки объемом 5 мл и добавляют 20 мкл сконцентрированных с 10 раз образцов антитела к EGFR (первичное антитело) (конечная концентрация 1-5000 нг/мл) или только PBS. После осторожного

перемешивания образцов пробирки инкубируют при 4°C в течение 30 мин. в темноте. Затем образцы дважды промывают буфером FACS осаждают при 300 x g в течение 3 минут. Супернатант отсасывают и помещают клетки в 50 мкл буфера FACS и добавляют 2 мкл фрагментов вторичного антитела (специфическое F(ab')₂-FITC к Fc) (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) и инкубируют пробирки при 4°C в течение 30 мин. Образцы дважды промывают буфером FACS и помещают в 500 мкл буфера FACS для анализа проточной цитометрией. Связывание определяют построением кривой зависимости среднего геометрического флуоресценции относительно концентраций антитела.

Связывание мономерных гликовариантов IgG1 с клеточной линией CHO, экспрессирующей FcγRIIIA

Клетки CHO трансфицируют с помощью электропорации (280 В, 950 мкФ, 0,4 см) экспрессирующим вектором, кодирующим α-цепь и γ-цепь FcγRIIIA-Val158. Трансфектанты отбирают добавлением 6 мкг/мл пурамицина и анализируют стабильные клоны с помощью FACS (сортировкой клеток по флуоресценции), используя 10 мкл FITC-конъюгированного моноклонального антитела к FcγRIII 3G8 (BD Biosciences, Allschwil/Швейцария) для 10⁶ клеток. Осуществляют связывание IgG1 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA-Val158. Вкратце, фрагменты F(ab')₂ 3G8 к FcγRIIIA (Ancell, Bayport, MN/USA) добавляют в концентрации 10 мкг/мл для полного связывания гликовариантов антитела (3 мкг/мл). Интенсивность флуоресценции, относящуюся к связанным вариантам антитела определяют на приборе FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Швейцария).

Анализ ADCC

Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) используют в качестве эффекторных клеток и получают с использованием Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA), следуя в основном инструкциям изготовителя. Вкратце, венозную кровь берут у здоровых добровольцев с помощью гепаринизированных шприцев. Кровь разводят 1:0,75-1,3 PBS (не содержащим Ca⁺⁺ или Mg⁺⁺) и наслаивают на Histopaque-1077. Градиент центрифугируют при 400 x g в течение 30 минут при комнатной температуре (КТ) без перерывов. Границу раздела фаз, содержащую PBMC, собирают и промывают PBS (50 мл/клетки из двух градиентов) и собирают

центрифугированием при $300 \times g$ в течение 10 минут при КТ. После
 ресуспендирования пеллеты в PBS PBMC подсчитывают и промывают во второй
 раз центрифугированием при $200 \times g$ в течение 10 минут при КТ. Затем клетки
 ресуспендируют в подходящей среде для последующих процедур.

Эффектор для целевого соотношения, используемого для анализов ADCC
 составляет 25:1 и 10:1 PBMC и NK-клеток, соответственно. Эффекторные клетки
 получают в среде AIM-V в подходящей концентрации, чтобы добавлять
 50 мкл/лунку круглодонных 96-луночных планшетов. Клетки-мишени
 представляют собой клетки, экспрессирующие EGFR человека (например, A431,
 EBC-1 или LN229), выращенные в DMEM, включающей 10% FCS. Клетки-
 мишени промывают в PBS, подсчитывают и ресуспендируют в AIM-V с густотой
 0,3 млн./мл, чтобы добавлять 30000 клеток в 100 мкл/микролунку. Антитела
 разводят в AIM-V, добавляют в 50 мкл к предварительно размещенным клеткам-
 мишеням и дают возможность связываться с мишенями в течение 10 минут при
 КТ. Затем добавляют эффекторные клетки и инкубируют планшет в течение 4
 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Уничтожение
 клеток-мишеней оценивают измерением высвобождения лактатдегидрогеназы
 (LDH) из поврежденных клеток при использовании набора для детекции
 цитотоксичности (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Швейцария). После 4-часового
 инкубирования планшеты центрифугируют при $800 \times g$. 100 мкл супернатанта из
 каждой лунки переносят в новый прозрачный плоскодонный 96-луночный
 планшет. На лунку добавляют 100 мкл буфера с цветным субстратом из набора.
 Значения V_{max} цветной реакции определяют в ридере для ELISA при длине
 волны 490 нм в течение по меньшей мере 10 мин., используя программу
 SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, США). Спонтанное
 высвобождение LDH измеряют в лунках, включающих только клетки-мишени и
 эффекторные клетки, но без антител. Максимальное высвобождение определяют
 в лунках, включающих только клетки-мишени и 1% Triton X-100. Процент
 опосредованного специфическим антителом уничтожения рассчитывают
 следующим образом: $((x - \text{SR})/(\text{MR} - \text{SR})) \times 100$, где x означает среднее V_{max} при
 специфической концентрации антитела, SR означает среднее V_{max} спонтанного
 высвобождения и MR означает среднее V_{max} максимального высвобождения.

Пример 2

Результаты и обсуждение

Сравнение связывания с рецептором человеческого EGF вариантов антитела I-HNA, I-HNB, I-HNC, I-HLA, I-HLB, I-HLC, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, I-HLA6, I-HLA7, I-HLA8, I-HLA-9, I-HND, I-HNE, I-HNF и I-HNG, комплексированных либо с легкой цепью химерного ICR62, либо с легкими цепями гуманизированного ICR62 (I-КА, I-КВ или I-КС), и исходного химерного антитела ch-ICR62 показывает, что все антитела имеют близкие значения EC50 внутри одной логарифмической единицы. Только I-HNA имеет сильно пониженную активность связывания (см. фиг. 2). Фиг. 1 показывает функциональную активность отдельных полипептидных цепей химерного ICR62 (ch-ICR62) при комбинировании с гуманизированными конструкциями I-HNC и I-КВ, соответственно. В данном эксперименте либо легкую цепь, тяжелую цепь либо обе цепи ch-ICR62 одновременно заменяют вышеупомянутыми гуманизированными конструкциями. Это показывает, что, по-видимому, формирование границы раздела VH/VL действует как в антителе грызунов, также и в гуманизированных конструкциях.

Как показано на фиг. 2, гуманизированная тяжелая цепь I-HNA не может восстановить активность связывания ни с легкой цепью I-КА, ни с легкой цепью I-КВ. Поскольку I-HLA все-таки демонстрирует связывание как с I-КА, так и с I-КВ, авторы изобретения заключают, что тяжелая цепь I-HNA не функциональна в плане связывания антигена. Фиг. 1 и 2 в сочетании с фиг. 3 показывают, что конструкции I-КА, I-КВ и I-КС демонстрируют поведение связывания, не отличающееся от аналога грызунов. Вариант I-КС не несет каких-либо обратных мутаций и, кроме того, имеет частично гуманизированный CDR1, так что остатки 24-29 могут быть выделены из человеческой акцепторной последовательности (A30 VK1, как отмечают выше).

В серии I-HNA, I-HNB и I-HNC только два последних варианта демонстрируют удовлетворительное поведение связывания (см. фиг. 2 и 3). Анализ последовательности I-HNA показывает три потенциальных остатка аминокислот, ответственные за данное поведение: Lys33, His35 и Tyr50. Конструкции, в которых Lys33 заменен тирозином, демонстрируют хорошее связывание, как и конструкции, в которых Tyr50 заменен триптофаном. Только когда данные два остатка заменяют аланином и глицином, соответственно,

происходит утрата связывания. Поскольку I-HNC не показывает улучшенного связывания относительно I-HNB, авторы изобретения делают заключение о том, что не требуется, чтобы остатки Asn60, Glu61, Lys64 и Ser65 происходили от грызунов, или они могут быть заменены Ala, Gln, Gln и Gly, соответственно. Данная процедура приводит к образованию конструкции, в которой CDR2 является более гуманизированным, поскольку положения аминокислот 60-65 являются частью определения CDR Kabat, но отсутствует необходимость прививать донорные остатки грызунов на данное антитело.

На фиг. 4 и 5 сравнивают конструкции серии I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5 и I-HLA6. Наилучшее поведение связывание наблюдают в конструкциях ch-ICR62, I-HLA1 и I-HLA2 при значении EC50 приблизительно 300 нг/мл. Другие конструкции имеют данное значение, умноженное на коэффициент два и, вследствие этого имеют немного пониженную активность связывания. Первое заключение, сделанное на основании данных результатов, состоит в том, что в CDR1 по Kabat допустимы замены Lys33Tyr и Ile34Met. Два данных положения входят в CDR1 по определению Kabat, но лежат вне связей CDR по Chothia (которые основаны на структурном анализе, а не анализе последовательности). В таком случае в последней части CDR1 допустима по меньшей мере некоторая неоднородность.

Второе заключение состоит в том, что в CDR2 кроме вышеупомянутой замены остатков Asn60 и Glu61 недонорными остатками, допустимы также недонорные замены Asn60Ser, Glu61Pro и Lys62Ser в CDR Kabat. Данные остатки выделяют из акцепторной последовательности человеческой зародышевой линии IGHV5-51, которую используют как акцепторную последовательность FR3. Конструкции I-HLA3 и I-HLA4 отличаются от I-HLA1 и I-HLA2 только удалением обратной мутации Phe27Tyr, и обе конструкции, I-HLA3 и I-HLA4, теряют аффинность по сравнению со своей исходной конструкцией. Вследствие этого третье заключение, полученное при сравнении I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5 и I-HLA6 состоит в том, что Phe27 участвует в связывании антигена либо непосредственно, либо опосредованно путем модификации конформации петли CDR1.

Варианты I-HLA5 и I-HLA6 имеют FR1 I-HLA1 и I-HLA2, соответственно, замененные другой акцепторной последовательностью зародышевой линии, в

которой естественным образом присутствует Phe27 (т.е. IGHV1-58). Это может достигаться только путем одновременной интродукции ряда других мутаций, которые представляют собой: Val2Met, Ala9Pro и Ala16Thr. В таком случае снова аннулируется благоприятный эффект реинтродукции Phe27.

Конструкцию I-HLA7 оценивают, чтобы определить, восстанавливает ли возвращение дополнительных донорных остатков в тяжелой цепи CDR1 и CDR2 конструкции I-HLA6 полную активность связывания по сравнению с ICR62. Как показано на фиг. 6, этого не происходит.

Как показано на фиг. 7 и 8, две дополнительные конструкции, I-HLA8 и I-HLA9, тестируют, чтобы определить, можно ли достигнуть полной активности связывания по сравнению с ch-ICR62. Начиная с конструкции I-HNB, участки FR1 заменяют участками FR1, имеющими максимальную гомологию с участком CDR1 Chothia. Конструкция I-HLA8 имеет FR1 последовательности IGHV1-58 и I-HLA9 имеет участок FR1 IGHV5-51. Обе конструкции связаны с антигеном по меньшей мере так же, как антитело ch-ICR62. Конструкция I-HLA8 может в действительности быть даже лучше при EC50, уменьшенной на коэффициент 2. Конструкция I-HLA8 имеет такую же последовательность FR1, как конструкции I-HLA5 и I-HLA6, и, вследствие этого, имеет такие недонорные остатки (т.е. Val2Met, Ala9Pro и Ala16Thr), позволяя предположить, что присутствие данных недонорных остатков не оказывает отрицательного воздействия на связывание. Неблагоприятные мутации, имеющиеся в I-HLA5 и -6 появляются от комбинации FR1 VH1, спаренной с FR3 VH5, которые потенциально можно было бы скомпенсировать при наличии FR1 и FR3 одного и того же семейства VH.

На фиг. 8 показаны конструкции, которые включают недонорные остатки в CDR. Таким образом данные конструкции являются даже более гуманизированными в CDR, поскольку на человеческих скелетных участках, которые выбраны для данных конструкций, имеются недонорные остатки. Все конструкции I-HNE (His35Ser), I-HNF (Thr58Asn) и I-HHG (Ser57Ala) имеют один остаток в CDR1 или CDR2, который является гуманизированным (по сравнению с конструкцией I-HNB). Оценивают также конструкцию I-HND (Gly24Ala). I-HNF демонстрирует пониженный уровень связывания, указывая на важность Thr58. В противоположность остатку 58 CDR Kabat аминокислота 57

является более толерантной к заменам, поскольку мутация Ser57Ala очевидным образом не влияет на связывание (см. фиг. 8).

Поскольку участок FR3 IGHV5-51, по-видимому, демонстрирует перспективные свойства в конструкциях I-HLA1 и 2 и FR1 той же последовательности зародышевой линии и, как показано, он эффективен в конструкции I-HLA9, то FR1, FR2 и FR3 IGHV5-51 конструируют для совместного использования в качестве акцептора для прививания петли.

Итоги анализа канонических остатков в гуманизированных конструкциях ICR62:

VL: Положение по Kabat 2: возможно, требуется Ile.

Положение по Kabat 71: допустимы Ile или Phe.

VH: Допустимы положения 24, Gly, Thr, Ala, Val, Ser.

Допустимы положения 26, Gly.

Допустимы положения 29, Phe, Ile, Leu, Val, Ser.

Допустимы положения 34, Ile, Met, Leu, Val, Trp, Tyr, Thr.

Допустимы положения 71, Ala, Leu, Val, Thr.

Допустимы положения 94, Arg, Gly, Asn, Lys, Ser, His, Thr, Ala.

Результаты экспериментов с ADCC

На фиг. 9 показывают сравнение опосредованной антителом клеточной цитотоксичности (ADCC) для различных гликоформ химерного антитела ICR62, а также для гуманизированного варианта I-HLA4. Различные гликоформы маркируют меткой, которая указывает либо негликоинженерную форму (WT), либо гликоформу 1 (G1) или гликоформу 2 (G2). "G1" относится к гликоинженерному созданию антитела путем соэкспрессии с GnTIII. "G2" относится к гликоинженерному созданию антитела путем соэкспрессии с GnTIII и ManII. "WT" относится к антителам, которые не подвергают гликоинженернигу. Легкой цепью для всех гуманизированных конструкций является вариант I-KC, и она однозначно не имеет метки.

Химерное, а также гуманизированное антитело подвергают усовершенствованию в плане активности и эффективности с использованием двух различных гликоинженерных подходов. Конструкция ch-ICR62 действует немного лучше, чем I-HLA4 в отношении дикого типа или гликоформ, соответственно. Как видно на фиг. 4, когда сравнивают аффинности двух

антитела в отношении их антигена, ch-ICR62 имеет значение EC50 в два раза ниже. Данная разница в аффинности в данном случае отражается в различиях в эффективности.

На фиг. 10 показывают сравнение опосредованной антителом клеточной цитотоксичности (ADCC) для негликоинженерной формы ("дикого типа") и гликоформы G2 конструкций I-HNB и I-HLA7 гуманизированного антитела ICR62. Эти же антитела используют в отношении двух различных клеточных линий-мишеней. На панели А фиг. 10 используют клеточную линию-мишень LN229 и на панели В фиг. 10 используют клеточную линию A431. Клетки A431, вероятно, более чувствительны в отношении уничтожения клеток, опосредованного антителом, чем клетки LN229. Более важно, что гликоинженеринг повышает активность обоих антител. Данный эффект кажется более выраженным для I-HLA7, чем для I-HNB. Долю гибели клеток при максимальной концентрации антител для I-HNB можно было бы сдвинуть с ~30% до ~40% путем интродукции гликоинженерного варианта G2 при использовании клеточной линии-мишени LN229. При использовании клеточной линии A431 данное значение, по-видимому, не изменяется. Данное поведение полностью отличается от антитела I-HLA7. Гибель клеток-мишеней при максимальной концентрации антитела сдвигается от приблизительно 10% до приблизительно 50% для клеток LN229 и от приблизительно 40% до приблизительно 70% для клеток A431 при интродукции гликоинженерных вариантов G2. В данном случае, несмотря на более низкую активность у негликогизированного антитела в отношении I-HLA7 по сравнению с I-HNB, ранжирование активности для гликоинженерных антител является обратным. Фиг. 11 и 12 также представляют сравнения негликоинженерных форм (WT) и гликоформ G2 химерного ICR62 и гуманизированных конструкций антитела ICR62 I-HNB и I-HLA7.

Пример 3

Предварительное изучение токсичности посредством внутривенного (болюсного) введения обезьянам макак-крабод – Биоаналитический анализ

Введение

Анализ гликоинженерного антитела к EGFR

Данный биоаналитический анализ описывает измерение антитела к EGFR в образцах, полученных от обезьян макак-крабод после внутривенного (болюсного) введения антитела к EGFR (рекомбинантного, гликоинженерного антитела к EGFR, продуцируемого трансфицированными клетками млекопитающих в культуре с помощью векторов, экспрессирующих антитело, несущих гены тяжелой цепи I-ННВ и легкой цепи I-КС, как описано выше, и очищенных по протоколу, приведенному в данном контексте ниже. В целом 78 образцов обезьяньей сыворотки хранят в замороженном виде при приблизительно -20°C до использования.

В биоаналитических способах, применяемых для определения антитела к EGFR, используют метод ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа) для измерения сывороточных концентраций антитела к EGFR. Критерии приемлемости приведены при $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ низкий уровень QC (контроля качества)) для точности и погрешности.

Материалы и способы

Цель: Целью данного исследования является оценка системного токсического потенциала внутривенного (болюсного) введения Glyco-mAb (антитела к EGFR) обезьянам макак-крабод с последующим 8-недельным периодом выздоровления.

Таблица 8

Модель на животном	Обезьяны макак-крабод, принятые регулирующими органами, имеются данные о происхождении.
Обоснование использования примата	Примат является видом выбора, отличным от грызунов, поскольку только он сохраняет два важных параметра: распознавание антигена EGFR тест-антителом и распознавание Fc-участка тест-антитела Fc-рецепторами иммунной системы.
Способ	Внутривенный (болюсный) для имитации состояний клинического применения.

Таблица 9: Группы лечения и дозы

Группа	1	2	3
Соединение	Glyco-mAb (Антитело к EGFR)		
Доза (мг/кг/день)	1,5	4,5	12

Обоснование выбора уровня дозы

1,5-7,5 мг/кг представляет собой ожидаемый интервал для исследований на человеке (7,5 мг/кг является соответствующей дозой для аналогичного соединения у человека).

Таблица 10: Идентичность групп лечения

Группа	Лечение	Доза (мг/кг/день) #	Число животных		Номера животных ID	
			Самцы	Самки	Самцы	Самки
1	Глико-mAb (Антитело к EGFR)	1,5	1	1	623	590
2	Глико-mAb (Антитело к EGFR)	4,5	1	1	461	462
3	Глико-mAb (Антитело к EGFR)	12	1	1	463	612

Выражают в переводе на тест-субстанцию, как добавляют.

Таблица 11: Животные

Вид	Обезьяна макак-крабед (целевое разведение)
Возраст при получении	Приблизительно 15 месяцев
Упорядоченный интервал массы тела	1,5-2,5 кг

Таблица 12: Введение антитела к EGFR

Способ	Внутривенная инъекция.
Лечат при дозе	Постоянные дозы в мг/кг/случай.
Объем дозы	Рассчитывают заранее на основе наиболее часто встречающейся зарегистрированной массы тела.
Объем индивидуальной дозы	1 мл/кг/день
Частота	Дни 1, 8, 15 и 22, непосредственно перед кормлением.
Последовательность	По группам.
Места введения дозы	С использованием левых подкожных вен.
Инъекция	Болюс, новая стерильная одноразовая игла/животное.
Препарат	Регистрацию применения препарата проводят на основе массы тела. Данное соотношение сравнивают с ожидаемым применением в качестве проверки правильного введения.

Таблица 13: Клинические наблюдения

Животные и их поддоны в клетках	Визуально проверяют по меньшей мере два раза в день для доказательства реакции на лечения или ухудшения состояния здоровья.
Отклонения от нормы, зарегистрированные в точке времени в отношении	Природа и тяжесть. Дата и время начала. Продолжительность и развитие наблюдаемого состояния.
Физическое исследование	Один раз в неделю для каждого животного.
Ежедневные регистрации содержимого поддонов в клетках	На предмет рвотных масс, крови, диареи и т.п.

Таблица 14: Частота дозирования:

Частота	1. Непосредственно перед дозой. 2. ½ - 2 часа после окончания введения дозы. 3. Насколько можно позднее в течение рабочего дня.
Места инъекции	Ежедневно.

Таблица 15: Токсикокинетика

День	Животные	Время отбора образцов (час.) после дозирования.
1	Все животные	1, 4, 12, 24, 72, 120.
8	Все животные	Перед введением дозы, 1 час после введения дозы (169 час. после введения дозы в День 1).
15	Все животные	Перед введением дозы, 1 час после введения дозы (337 час. после введения дозы в День 1).
22	Все животные	Перед введением дозы, 1 час после введения дозы (505 час. после введения дозы в День 1).
29	Все животные	672 после введения дозы в День 1.

Таблица 16: Образцы

Место отбора образца	Подходящая вена.
Антикоагулянт/объем образца	Без антикоагулянта/0,7 мл.
Общее число взятых образцов	104.
Разделение сыворотки	Центрифугированием при комнатной температуре, пока не указано иначе, для получения минимум 0,3 мл, когда это возможно.
Хранение сыворотки	Соответствующим образом этикетированные пластиковые пробирки. Глубокая заморозка (приблизительно -20°C), до проведения биоанализа.

Гистология

Таблица 17: Фиксация тканей

Стандарт	10% нейтральный забуференный формалин.
Другие	Яички и придатки яичек: исходно в среде Боуина. Глаза: исходно в среде Девидсона.

Таблица 18: Гистология

Обработка	Все животные.
Рутинное окрашивание	Срезы толщиной 4-5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином.

Способ иммуноанализа

Планшет покрывают 100 мкл/лунку покрывающего раствора (5 мкл овечьего IgG к человеку (адсорбированный обезьяний IgG, связывающий центр, UK), добавленного к 11495 мкл бикарбонатного буфера (0,05М, pH 9,6) и инкубируют в течение приблизительно 2 часов при комнатной температуре. Планшет трижды промывают 400 мкл/лунку раствора для промывания (PBS (Sigma Chemical Co., UK) 0,01% (об./об.) Triton-X100 (Sigma Chemical Co., UK)) и промокают насухо.

Буфер для анализа (1% масс./об. BSA, Sigma Chemical Co., UK) добавляют по 200 мкл/лунку и инкубируют в течение приблизительно 1 часа при комнатной температуре. Планшет трижды промывают 400 мкл/лунку раствора для промывания и промокают насухо.

Калибровочные стандарты, Контроли качества (QC) и/или образцы добавляют по 100 мкл/лунку и инкубируют в течение приблизительно 2 часов при комнатной температуре, после чего планшет трижды промывают 400 мкл/лунку раствора для промывания и промокают насухо.

Раствор конъюгата (6 мкл конъюгата козьего IgG-к к человеку-HRP (пероксидаза хрена) (Bethyl Laboratories Inc., США), введенного в 12 мл буфера для анализа) добавляют по 100 мкл/лунку и инкубируют в течение приблизительно 1 часа при комнатной температуре. Планшет трижды промывают 400 мкл/лунку раствора для промывания и промокают насухо.

Триметилбензидин (ТМБ; Europa Bioproducts, Ely, UK) добавляют по 100 мкл/лунку. Планшет покрывают и инкубируют в течение приблизительно 15 минут при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляют 100 мкл блокирующего раствора (0,5 М HCl, Fisher, UK). Значения поглощения читают

при длине волны 450 нм (эталонный фильтр 630 нм) на ридере для микропланшетов (Mettler Instruments, UK).

Результаты и обсуждение

Анализ тест-образцов

Концентрации антитела к EGFR измеряют методом иммуноанализа (ELISA) в 78 образцах обезьяньей сыворотки, полученных согласно протоколу, описанном у в данном контексте выше. Данные результаты представляют в табл. 19-21 ниже.

Таблица 19

Сывороточная концентрация антитела к EGFR в обезьяньей сыворотке (мкг/мл) после внутривенного введения 1,5 мг/кг антитела к EGFR в дни 1, 8, 15 и 22

(Группа 1)

Точка времени	Номер животного		Среднее значение	sd
	1M 623	1F 590		
День 1, 1 час	33,42	30,86	32,14	1,8
День 1, 4 часа	27,33	27,49	27,41	0,1
День 1 12 часов	13,09	17,01	15,05	2,8
День 1, 24 часа	9,656	9,468	9,562	0,1
День 1, 72 часа	2,528	0,786	1,657	1,2
День 1, 120 часов	0,845	0,431	0,638	0,3
День 8, перед введением дозы	0,538	0,287	0,413	0,2
День 8, 1 час	30,02	19,07	24,55	7,7
День 15, перед введением дозы	0,902	0,382	0,642	0,4
День 15, 1 час	17,91	33,08	25,50	10,7
День 22, перед введением дозы	1,065	0,595	0,830	0,3
День 22, 1 час	19,41	33,00	26,21	9,6
День 1, 672 часа	1,202	0,362	0,782	0,6

sd – стандартное отклонение

Таблица 20

Сывороточная концентрация антитела к EGFR в обезьяньей сыворотке (мкг/мл) после внутривенного введения 5,0 мг/кг антитела к EGFR в дни 1, 8, 15 и 22

(Группа 2)

Точка времени	Номер животного		Среднее значение	sd
	2M 461	2F 462		
День 1, 1 час	32,45	29,51	30,98	2,1
День 1, 4 часа	32,39	29,57	30,98	2,0
День 1, 12 часов	28,05	25,88	26,97	1,5
День 1, 24 часа	23,70	23,78	23,74	0,1

Точка времени	Номер животного		Среднее значение	sd
	2M 461	2F 462		
День 1, 72 часа	14,03	14,38	14,21	0,2
День 1, 120 часов	10,42	8,137	9,279	1,6
День 8, перед введением дозы	4,672	3,683	4,178	0,7
День 8, 1 час	25,91	31,06	28,49	3,6
День 15, перед введением дозы	5,752	5,450	5,601	0,2
День 15, 1 час	32,20	35,38	33,79	2,2
День 22, перед введением дозы	BLQ	6,497	3,249	-
День 22, 1 час	26,98	30,23	28,61	2,3
День 1, 672 часа	BLQ	4,845	2,423	-

BLQ нижний предел количественного определения (<0,195 мкг/мл)

sd стандартное отклонение

Замечание: BLQ входит в расчеты с нулевым значением

Таблица 21

Сывороточная концентрация антитела к EGFR в обезьяньей сыворотке (мкг/мл) после внутривенного введения 15 мг/кг антитела к EGFR в дни 1, 8, 15 и 22 (Группа 3)

Точка времени	Номер животного		Среднее значение	sd
	3M 463	3F 612		
День 1, 1 час	262,2	168,0	215,1	66,6
День 1, 4 часа	223,3	174,5	198,9	34,5
День 1, 12 часов	164,9	165,7	165,3	0,6
День 1, 24 часа	141,7	146,0	143,9	3,0
День 1, 72 часа	99,54	86,64	93,09	9,1
День 1, 120 часов	86,64	69,08	77,86	12,4
День 8, перед введением дозы	65,86	45,21	55,54	14,6
День 8, 1 час	282,1	209,9	246,0	51,1
День 15, перед введением дозы	98,43	71,21	84,82	19,2
День 15, 1 час	385,9	231,4	308,7	109,2
День 22, перед введением дозы	117,3	105,6	111,5	8,3
День 22, 1 час	234,1	402,5	318,3	119,1
День 1, 672 часа	127,5	122,9	125,2	3,3

sd - стандартное отклонение

Пример 4

Предварительное исследование токсичности путем внутривенного (болюсного) введения обезьяне макак-крабод – Токсикокинетика

Итоги

Три группы обезьян макак-крабоед (1 самец и 1 самка на группу) вводят внутривенные болюсные дозы антитела к EGFR в Дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного исследования токсичности для того, чтобы оценить системное воздействие антитела к EGFR на животных. Сывороточные концентрации антитела к EGFR в образцах, собранных через 672 часа после введения первой дозы, определяют методом иммуноанализа. Фармакокинетический анализ данных по зависимости сывороточной концентрации от времени дает в результате следующие фармакокинетические параметры:

Таблица 22

Доза (мг/кг)	Животное	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (час.)	AUC _t * (мкг.час./мл)	AUC (мкг.час./мл)	CL (мл/час./кг)	V _{ss} (мл/кг)	k (1/час.)	t _{1/2} (час.)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a
^a представляет собой приблизительную оценку, поскольку результат не соответствует всем критериям приемлемости, определенным при обработке данных, и его следует применять с осторожностью									

* - площадь под кривой

Связи между площадями под кривой зависимости сывороточной концентрации антитела к EGFR от времени (AUC₁₆₈) и уровнем дозы в День 1 представлены ниже:

Таблица 23

Уровень дозы (мг/кг/случай)	Уровень дозы соотношение	Соотношение AUC ₁₆₈	
		Самцы	Самки
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

Скорость и степень системного воздействия антитела к EGFR на обезьян, характеризующиеся AUC₁₆₈, повышаются примерно пропорционально с увеличением дозы в интервале доз 1,5-4,5 мг/кг/случай, но больше чем

пропорционально при увеличении дозы в интервале 4,5-12 мг/кг/случай в День 1. В самой высокой дозе (12 мг/кг/случай) AUC_{168} превышает приблизительно в 2,8 раза предсказанную исходя из линейной зависимости.

Степень (AUC_{168}) системного воздействия антитела к EGFR на самок обезьян в целом аналогична воздействию на самцов обезьян.

После повторных внутривенных доз сывороточные концентрации антитела к EGFR перед дозой, как правило, превышают значения, полученные после однократной дозы, и указывают на кумуляцию антитела к EGFR в сыворотке на протяжении периода исследования.

Конечный полупериод существования не может быть адекватно оценен для всех животных, но в случаях, когда его можно оценить, он лежит в интервале 32,5-63,1 часа и, по-видимому, увеличивается вместе с дозой у самцов животных. Общий сывороточный клиренс антитела к EGFR, по-видимому, не зависит от дозы в интервале 1,5-4,5 мг/кг/случай, но снижается при максимальном уровне дозы у самцов и самок обезьян.

В заключение степень системного воздействия антитела к EGFR на обезьяну макак-крабед, по-видимому, характеризуется нелинейной (дозозависимой) кинетикой в интервале доз 1,5-12 мг/кг/случай в День 1 исследования токсичности при внутривенном введении. Увеличение дозы антитела к EGFR выше 4,5 мг/кг/случай, очевидно, приведет в результате к более сильному системному воздействию, чем можно было бы предсказать на основании линейной зависимости, которая согласуется с вероятностью процесса с ограниченной способностью в плане удаления антитела к EGFR.

Кроме того, исследование также представляет доказательство того, что, как правило, отсутствует разница в системном воздействии антитела к EGFR на самцов и самок обезьян и что происходит кумуляция после повторного внутривенного введения.

Введение

Трем группам из одного самца и одной самки обезьян макак-крабед вводят антитело к EGFR внутривенной болюсной инъекцией при уровне доз 1,5, 4,5 и 12 мг/кг/случай в Дни 1, 8, 15 и 22 предварительного исследования токсичности. У каждого животного берут образцы крови в следующие точки времени после введения в День 1: 1, 4, 12, 24, 72 и 120 часов после введения дозы. Кроме того,

образцы берут перед введением дозы и через 1 час после введения дозы в Дни 8, 15 и 22 и через 672 часов после введения первой дозы в День 1. Отделенную сыворотку замораживают при приблизительно -20°C перед проведением анализа сывороточных концентраций антитела к EGFR методов иммуноанализа.

Сокращения

AUC	Площадь под кривой зависимости сывороточной концентрации от времени до бесконечного времени
AUC ₁₆₈	Площадь под кривой зависимости сывороточной концентрации от времени за 168-часовой период дозирования
BLQ	Ниже предела количественного определения
ca	Приблизительно
CL	Общий сывороточный клиренс
C _{max}	Максимальная сывороточная концентрация
F	Самка
k	Константа конечного уровня
M	Самец
t _½	Конечный полупериод существования
T _{max}	Время, в которое существует C _{max}
V _{ss}	Объем распространения в устойчивом состоянии

Антитело, используемое в исследовании

Глико-mAb (анти-EGFR), антитело к EGFR, подвергнутое Fc-инженерингу с целью получения повышенной аффинности связывания рецептора Fc-FcγRIII и повышенной ADCC, получают, очищают и характеризуют, как описано выше. Вкратце, антитело получают сотрансфекцией клеток HEK-293-EBNA с плазмидными ДНК-векторами, предназначенными для экспрессии тяжелой цепи антитела I-HNB, легкой цепи антитела I-KC, GnT-III и ManII. Используют линейно масштабируемый вариант вышеописанного способа трансфекции, монослои трансфицированных клеток культивируют в роллерных флаконах вместо Т-колб. Дополнительную стадию проточной анионообменной хроматографии с использованием Q-сефарозной матрицы включают в способ

очистки непосредственно перед вышеописанной стадией эксклюзионной хроматографии по размеру.

Тип гликозилирования Fc-инженерного антитела анализируют, как описано выше, при использовании спектрометрии MALDI/TOF-MS высвобожденных под действием ферментов выделенных из Fc олигосахаридов. Профиль олигосахаридов показан на фиг. 23.

Связывание человеческого EGFR и обезьяньего EGFR демонстрируют по связыванию целых клеток, как описано выше, с использованием клеток A431 и COS-7, соответственно, и анализа на основе FACS. Кривые связывания показаны на фиг. 24 и 25, соответственно.

Повышенный уровень связывания рецептора FcγRIII, полученный в результате использования Fc-инженеринга, показывают, как описано выше, с помощью связывания целых клеток с клетками CHO, сконструированными для экспрессии на поверхности человеческого FcγRIII, и анализа на основе FACS. Результаты показаны на фиг. 26. Кроме того, инженерное антитело имеет степень Fc-инженеринга, эквивалентную антителу "Глико-2" (75% олигосахаридов на Fc нефукозилированного типа), описанному в другом материале (см. статью Ferrara, C. et al., J Biol Chem. 5 декабря 2005 г.; [электронное издание перед печатью]). Данные Fc-инженерные антитела обладают более чем в 50 раз повышенной аффинностью связывания в отношении человеческого FcγRIII относительно стандартного не-Fc-инженерного антитела (равновесная константа диссоциации 15 и 150 нМ для полиморфных вариантов 158V и 158F человеческого рецептора относительно 750 и 5000 нМ для тех же вариантов рецептора, соответственно, при связывании с не-Fc-инженерными антителами IgG1 человека).

ADCC измеряют, как описано выше, используя две линии клеток-мишеней: клетки карциному легкого человека A549 и клетки кератиноцитов обезьяны макака-крабоеда CYNOM-K1. Результаты представлены на фиг. 27 и 28, соответственно.

Обработка данных

Фармакокинетические параметры рассчитывают, используя компьютерную программу WinNonlin Pro version 3.3 (Pharsight Corporation, USA).

Все сывороточные концентрации, введенные в качестве части данного исследования, представлены до 4 значимых цифр или 3 десятичных разрядов. Фармакокинетические параметры представляют следующим образом: C_{max} , AUC_{168} , CL и V_{ss} до 4 значимых цифр; k до 4 десятичных разрядов; $t_{1/2}$ до 1 десятичного разряда.

Значения, составляющие BLQ ($<0,195$ мкг/мл) входят как нулевые значения в обработку фармакокинетических данных.

Токсикокинетика

Исследуемые величины представляют собой максимальные сывороточные концентрации антитела к EGFR (C_{max}) и их периоды существования (T_{max}). Площади под кривыми зависимости концентрации сывороточного антитела к EGFR от времени в течение 168-часового интервала дозирования (AUC_{168}) оценивают согласно линейной формуле трапеций. При расчете значений AUC_{168} концентрации сывороточного антитела к EGFR в нуль часов оценивают путем обратной экстраполяции при использовании log-линейного регрессионного анализа на основе времени отбора первых двух образцов, однако, если сывороточная концентрация не снижается в данный период, то сывороточную концентрацию в нуль часов считают равной концентрации во время первого отбора образца. Площади под кривыми зависимости концентрации сывороточного антитела к EGFR от времени до бесконечности (AUC) определяют с помощью следующего выражения:

$$AUC = AUC_{168} + C_{last}/k,$$

в котором C_{last} представляет собой предсказанную сывороточную концентрацию в последней точке количественно определяемого образца и k представляет собой константу конечного уровня.

Константы конечного уровня (k) оценивают путем построения линейной регрессии \log концентрации относительно времени. Для оценки k в плане приемлемости в качестве достоверного, устанавливают следующие критерии:

1. Конечные точки данных, вероятно, случайным образом распределены около одной прямой линии (при визуальном исследовании)
2. Для регрессии имеются минимум 3 точки данных
3. Коэффициент регрессии составляет $\geq 0,95$, и фракцию дисперсии принимают за $\geq 0,90$

4. Интервал, включающий точки данных, выбранный для регрессии, по меньшей мере в два раза превышает сам период полусуществования

Конечные периоды полусуществования ($t_{1/2}$) рассчитывают как $\ln 2/k$. Общий сывороточный клиренс (CL) рассчитывают как Доза/AUC. Объем распространения в устойчивом состоянии (V_{ss}) рассчитывают как Доза.AUMC/AUC². Кумуляцию (R) оценивают как соотношение минимальной концентрации после введения последней дозы (День 22) и минимальной концентрации после введения первой дозы (День 1), т.е. сывороточной концентрации на 672 часа/сывороточной концентрации на 168 часов (перед введением дозы в День 8).

Результаты и обсуждение

Образцы крови берут через 120 часов после введения дозы в День 1; перед введением дозы и через 1 час после введения дозы в Дни 8, 15 и 22 и через 672 часа после введения дозы в День 1 в период исследования токсичности с целью оценки системного воздействия на самцов и самок обезьян антитела к EGFR после внутривенного болюсного введения антитела к EGFR при уровнях доз 1,5, 4,5 и 12 мг/кг/случай в Дни исследования 1, 8, 15 и 22. Сывороточные концентрации антитела к EGFR в образцах, взятых через 168 часов после введения дозы, представлены в табл. 27-29 и профили зависимости средняя сывороточная концентрация-время иллюстрируют на фиг. 18 и 19.

Фармакокинетические параметры антитела к EGFR представлены в табл. 50 и значения AUC₁₆₈ суммированы ниже:

Таблица 24

Уровень дозы	AUC ₁₆₈ (мкг.час./мл)	
(мг/кг/случай)	Самцы	Самки
1,5	830,4	748,4
4,5	2537	2378
12	18310	15980

Периоды, в которые существуют максимальные сывороточные концентрации (T_{max}), составляют, как правило, 1 час после введения дозы (точка первого образца), но существуют через 4 часа после введения дозы (точка второго образца) у самок 2F462 (4,5 мг/кг) и 3F612 (12 мг/кг). Однако для обеих данных самок концентрации через 4 часа после введения дозы очень близки к

тем концентрациям, которые имеются через 1 час после введения дозы, и находятся, возможно, в рамках вариабельности анализа. Вследствие этого маловероятно, что очевидная задержка T_{\max} имеет какую-либо значимость.

Сывороточные концентрации антитела к EGFR перед введением последующей дозы количественно определяют у всех животных за исключением самца 2М461 в День 22 (уровень дозы 4,5 мг/кг/случай) поэтому, как правило, животные постоянно подвергают воздействию количественно определяемых концентраций антитела к EGFR во период интервала между введением доз.

Связи между площадями под кривой зависимости концентрации сывороточного антитела к EGFR от времени (AUC_{168}) и уровнем дозы в День 1 приводят ниже:

Таблица 25

Уровень дозы	Уровень дозы	Соотношение AUC_{168}	
(мг/кг/случай)	Соотношение	Самцы	Самки
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

Скорость и степень системного воздействия антитела к EGFR на обезьян, характеризующиеся AUC_{168} , повышаются примерно пропорционально с увеличением дозы в интервале доз 1,5-4,5 мг/кг/случай, но больше чем пропорционально при увеличении дозы в интервале 4,5-12 мг/кг/случай в День 1. В самой высокой дозе (12 мг/кг/случай) AUC_{168} превышает приблизительно в 2,8 раза предсказанную исходя из линейной зависимости (см. фиг. 20).

Степень (AUC_{168}) системного воздействия антитела к EGFR на самок обезьян в целом аналогична воздействию на самцов обезьян.

После повторных внутривенных доз сывороточные концентрации антитела к EGFR перед введением дозы, как правило, превышают значения, полученные после однократной дозы (см. фиг. 21-22) и указывают на кумуляцию антитела к EGFR в сыворотке на протяжении периода исследования. Данная кумуляция, как правило, ниже у самок, чем у самцов за исключением самого высокого уровня доз. Соотношения минимальных (перед введением дозы)

концентраций после введения последней дозы в День 22 (672 часа после введения дозы в День 1) и минимальной концентрации после введения первой дозы в День 1 представляют в табл. 26 ниже:

Таблица 26

Уровень дозы (мг/кг/случай)	R	
	Самцы	Самки
1,5	2,23	1,26
4,5	*	1,32
12	1,94	2,72
*Невозможно рассчитать, поскольку минимальная концентрация является BLQ		

Константы конечного уровня (k) и соответствующие конечные полупериоды существования ($t_{1/2}$) антитела к EGFR в День 1 представляют в табл. 30. Конечный полупериод существования не может быть адекватно оценен для всех животных, но в случаях, когда его можно оценить, он лежит в интервале 32,5-63,1 часа и, по-видимому, увеличивается вместе с дозой у самцов животных. Общий сывороточный клиренс антитела к EGFR, по-видимому, не зависит от дозы в интервале 1,5-4,5 мг/кг/случай, но снижается при максимальном уровне дозы у самцов и самок обезьян.

В заключение степень системного воздействия антитела к EGFR на обезьяну макак-крабоед, по-видимому, характеризуется нелинейной (дозозависимой) кинетикой в интервале доз 1,5-12 мг/кг/случай в День 1 исследования токсичности при внутривенном введении. Увеличение дозы антитела к EGFR выше 4,5 мг/кг/случай, очевидно, приведет в результате к более сильному системному воздействию, чем можно было бы предсказать на основании линейной зависимости, которая согласуется с вероятностью процесса с ограниченной способностью в плане удаления антитела к EGFR.

Кроме того, исследование также представляет доказательство того, что, как правило, отсутствует разница в системном воздействии антитела к EGFR на самцов и самок обезьян и что происходит кумуляция после повторного внутривенного введения.

Таблица 27

Сывороточные концентрации (мкг/мл) антитела к EGFR в обезьяньей сыворотке после внутривенного введения 1,5 мг/кг антитела к EGFR в Дни 1, 8, 15 и 22

Точка времени	Номер животного	
	1M 623	1F 590
День 1, 1 час	33,42	30,86
День 1, 4 часа	27,33	27,49
День 1, 12 часов	13,09	17,01
День 1, 24 часа	9,656	9,468
День 1, 72 часов	2,528	0,786
День 1, 120 часов	0,845	0,431
День 8, перед введением дозы	0,538	0,287
День 8, 1 час	30,02	19,07
День 15, перед введением дозы	0,902	0,382
День 15, 1 час	17,91	33,08
День 22, перед введением дозы	1,065	0,595
День 22, 1 час	19,41	33,00
День 1, 672 часов	1,202	0,362

Таблица 28

Сывороточные концентрации (мкг/мл) антитела к EGFR в сыворотке обезьян макак-крабоед после внутривенного введения 4,5 мг/кг антитела к EGFR в Дни 1, 8, 15 и 22

Точка времени	Номер животного	
	2M 461	2F 462
День 1, 1 час	32,45	29,51
День 1, 4 часа	32,39	29,57
День 1, 12 часов	28,05	25,88
День 1, 24 часа	23,70	23,78
День 1, 72 часа	14,03	14,38
День 1, 120 часов	10,42	8,137
День 8, перед введением дозы	4,672	3,683
День 8, 1 час	25,91	31,06
День 15, перед введением дозы	5,752	5,450
День 15, 1 час	32,20	35,38
День 22, перед введением дозы	BLQ	6,497
День 22, 1 час	26,98	30,23
День 1, 672 часа	BLQ	4,845

Таблица 29

Сывороточные концентрации (мкг/мл) антитела к EGFR в сыворотке обезьян макак-крабод после внутривенного введения 12 мг/кг антитела к EGFR в Дни 1, 8, 15 и 22

Точка времени	Номер животного	
	1M 623	1F 590
День 1, 1 час	262,2	168,0
День 1, 4 часа	223,3	174,5
День 1, 12 часов	164,9	165,7
День 1, 24 часа	141,7	146,0
День 1, 72 часа	99,54	86,64
День 1, 120 часов	86,64	69,08
День 8, перед введением дозы	65,86	45,21
День 8, 1 час	282,1	209,9
День 15, перед введением дозы	98,43	71,21
День 15, 1 час	385,9	231,4
День 22, перед введением дозы	117,3	105,6
День 22, 1 час	234,1	402,5
День 1, 672 часов	127,5	122,9

Таблица 30

Фармакокинетические параметры антитела к EGFR в День 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR обезьянам макак-крабод

Доза (мг/кг)	Живот-нос	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (час.)	AUC _t (мкг.час./мл)	AUC (мкг.час./мл)	CL (мл/час./кг)	V _{ss} (мл/кг)	k (1/час.)	t _{1/2} (час.)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a

^a Значение представляет собой приблизительную оценку, поскольку данное не соответствует всем критериям приемлемости, определенным при обработке данных, и его следует применять с осторожностью

Биохимический анализ крови и гематология

Образцы крови берут из бедренной вены обезьян макак-крабод, которым сделана внутривенная болюсная инъекция антитела к EGFR GlycoMAB в дни 1, 8, 15 и 22. Образцы берут из конечности, не используемой для введения дозы,

после пищевой депривации в течение ночи (у не погибших). Образцы исследуют в период перед лечением, через три дня после введения второй дозы и по окончании по следующим параметрам, используя гепарин литий в качестве антикоагулянта:

Щелочная фосфатаза

Аланинаминотрансфераза

Аспартатаминотрансфераза

Билирубин – общий

Мочевина

Креатинин

Глюкоза

Холестерин – общий

Триглицериды

Натрий

Калий

Хлорид

Кальций

Фосфор

Общий белок

Электрофореграмма белка

Соотношение альбумин/глобулин

Средние данные биохимического анализа крови обезьяны макак-крабод представлены в табл. 31.

Таблица 31

Обезьяны макак-крабод (происхождение - Маврикий)- Химия крови

Парамстр	пол	n	1%	5%	50%	95%	99%	Среднее	Ст. откл.
ALP	M*	949	837	1339	2147	3201	3899	2175,5	565,44
	F**	881	946	1342	2144	3163	3740	2164,1	552,82
ALP-N	M	511	481	579	881	1453	1771	928,0	260,88
	F	499	427	546	846	1362	1694	879,5	240,24
ALT	M	1489	24	30	50	87	127	53,7	19,07
	F	1407	23	28	46	84	111	49,3	18,65
AST	M	1487	26	30	41	63	101	43,6	17,57
	F	1404	25	29	39	61	89	41,7	13,59
gGT	M	663	95	118	178	292	342	188,5	52,47
	F	641	81	102	153	232	266	158,6	38,38
LAP	M	207	18	26	40	79	217	45,1	28,25
	F	205	15	20	35	62	89	37,1	12,73
GLDH	M	159	8	10	17	35	126	20,1	16,46

Параметр	пол	n	1%	5%	50%	95%	99%	Среднее	Ст. откл.
	F	159	6	8	15	27	35	16,3	5,97
Билирубин	M	1494	1	1	3	8	11	3,8	2,04
	F	1413	1	2	4	8	11	4,1	2,07
LDH	M	99	160	596	808	1166	2029	838,3	218,75
	F	82	477	529	711	945	1021	715,0	117,07
СРК	M	331	68	83	179	713	1867	287,4	464,03
	F	335	57	77	184	925	2628	309,7	534,02
Непрямой билирубин	M	59	1	2	4	10	11	4,2	2,15
	F	57	1	2	4	5	7	3,6	1,13
Прямой билирубин	M	59	0	0	0	2	3	0,2	0,65
	F	57	0	0	0	1	3	0,2	0,52
Желчные кислоты	M	386	0,9	2,5	6,4	15,3	23,4	7,38	4,574
	F	380	1,4	3,0	7,0	12,9	17,8	7,41	3,474
Мочевина	M	1457	3,01	3,66	5,50	8,81	10,53	5,775	1,5710
	F	1379	2,77	3,42	5,33	8,56	9,90	5,559	1,5432
Креатинин	M	1458	55	59	71	87	94	71,6	8,67
	F	1383	56	60	72	87	85	72,7	8,36
Глюкоза	M	1455	2,22	2,64	3,71	5,21	6,37	3,809	0,8135
	F	1380	2,23	2,65	3,63	5,18	6,34	3,735	0,7990
Холестерин	M	1455	1,69	1,93	2,68	3,55	3,96	2,706	1,4909
	F	1382	1,83	2,15	2,86	3,69	4,05	2,885	0,4813
ЛВП-холест.	M	45	1,26	1,34	1,79	2,23	2,59	1,784	0,3128
	F	45	1,09	1,31	1,82	2,43	2,55	1,844	0,3179
ЛОНП-холест.	M	45	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11	0,004	0,0175
	F	45	0,00	0,00	0,00	0,12	0,19	0,012	0,0370
NEFA	M	132	0,10	0,28	0,98	1,84	2,44	0,994	0,4700
	F	132	0,14	0,22	1,06	1,90	2,18	1,070	0,4704
Триглицериды	M	1453	0,26	0,32	0,53	0,86	1,30	0,561	0,2051
	F	1374	0,26	0,34	0,57	0,90	1,14	0,587	0,1778
Фосфолипид	M	64	1,65	1,68	2,18	2,91	3,15	2,254	0,3769
	F	49	1,77	1,83	2,44	2,91	2,98	2,405	0,3267
Мочевая кислота	M	17	0	0	0	8	8	1,1	2,34
	F	17	0	0	0	1	1	0,4	0,51
Na	M	1461	141	142	147	152	155	146,8	3,00
	F	1382	140	142	147	153	157	147,3	3,34
K	M	1460	3,2	3,4	4,0	5,0	5,6	4,08	0,511
	F	1382	3,2	3,3	4,0	4,9	5,4	4,01	0,484
Cl	M	1461	102	104	108	112	115	107,7	2,71
	F	1382	102	104	108	113	116	108,4	2,83
Ca	M	1462	2,31	2,39	2,56	2,76	2,87	2,568	0,1176
	F	1382	2,32	2,39	2,57	2,77	2,89	2,572	0,1168
Фосфат	M	1172	1,16	1,40	1,93	2,43	2,69	1,921	0,3126
	F	1098	1,17	1,37	1,84	2,35	2,60	1,844	0,2978
ЛНП-холест.	M	45	0,54	0,62	1,20	1,87	1,92	1,253	0,3694

Параметр	пол	n	1%	5%	50%	95%	99%	Среднее	Ст. откл.
	F	45	0,69	0,78	1,19	1,83	1,88	1,233	0,2906
Бикарбонат	M	288	7	10	17	22	25	16,5	3,51
	F	283	6	10	16	22	25	15,9	3,81
Общий белок	M	1455	71	74	80	87	90	80,2	4,06
	F	1381	71	74	81	89	92	81,2	4,32
Альбумин (химич.)	M	346	34	38	43	46	49	42,6	2,67
	F	342	36	38	43	47	49	42,7	2,60
Альбумин	M	1089	33	36	45	51	54	44,3	4,46
	F	1019	34	37	45	52	55	44,7	4,58
Глобулин	M	289	31	32	36	41	45	36,3	2,83
	F	285	30	32	37	43	48	37,5	3,59
Соотн. А/Г (химич.)	M	340	0,79	0,98	1,17	1,39	1,45	1,172	0,1215
	F	336	0,84	0,95	1,14	1,34	1,42	1,143	0,1274
Соотн А/Г	M	1068	0,68	0,80	1,26	1,65	1,82	1,252	0,2522
	F	998	0,67	0,79	1,26	1,66	1,81	1,247	0,2647
Глобулин A1	M	1105	2	2	3	4	4	2,8	0,62
	F	1035	2	2	3	4	5	2,8	0,64
Глобулин A2	M	1105	3	3	4	6	7	4,2	0,92
	F	1035	3	3	4	6	7	4,2	1,01
β- глобулин	M	1105	12	13	16	22	24	16,6	2,63
	F	1035	12	13	16	22	25	16,8	2,85
γ- глобулин	M	1105	8	9	12	17	18	12,6	2,26
	F	1035	8	9	13	17	20	13,1	2,52
Альдолаза	M	96	9	14	21	38	57	22,0	7,48
	F	97	10	13	19	48	84	21,9	11,91
Плазм. СНЕ	M	17	4159	4159	5745	9160	9160	5919,8	1181,68
	F	17	3371	3371	5869	8367	8367	5689,2	1512,98
CRP	M	57	0,000	0,000	0,002	0,013	0,026	0,0032	0,00414
	F	56	0,000	0,000	0,002	0,004	0,007	0,0017	0,00167
T3	M	40	1,90	1,90	2,50	3,38	3,58	2,537	0,4011
	F	40	1,71	1,96	2,59	3,06	4,02	2,631	0,3799
T4	M	40	35	42	59	86	92	59,7	11,84
	F	40	38	40	56	81	107	58,6	14,37

Ст. откл. – стандартное отклонение

* - самцы

** - самки

ALP – щелочная фосфатаза

ALP-N

ALT – аланин-аминотрансфераза

AST - аспартат-аминотрансфераза

gGT – γ-глутамил-транспептидаза

LAP – лейцин-аминопептидаза

GLDH – глутаматдегидрогеназа

LDH - лактатдегидрогеназа

CPK - креатинкиназа

NEFA – незэстерифицированные жирные кислоты

A/Г альбумин/глобулин

CHE – холинэстераза

CRP – С-реактивный белок

Образцы для гематологического анализа периферической крови отбирают из бедренной вены обезьяны макак-крабоед, которая получает внутривенную болюсную инъекцию антитела ГликоМАВ к EGFR в дни 1, 8, 15 и 22. Образцы берут из конечности, не используемой для введения дозы после пищевой депривации в течение ночи (у непогибших). Образцы исследуют в период перед лечением, через три дня после введения второй дозы и по окончании по следующим параметрам:

1) Использование ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты) в качестве антикоагулянта -

Гематокрит Концентрация гемоглобина

Число эритроцитов

Ретикулоциты

Среднее содержание гемоглобина в эритроците

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците

Средний объем клетки

Общее число лейкоцитов

Число различных лейкоцитов

Число тромбоцитов

Отклонения в морфологии крови

Анизоцитоз

Микроцитоз

Макроцитоз

Гипохромазия

Гиперхромазия

2) Использование цитрата в качестве антикоагулянта –

Протромбиновое время

Активированное частичное тромбопластиновое время

Средние данные гематологического анализа обезьян макак-крабод
представляют в табл. 32.

Таблица 32

Обезьяны макак-крабод (происхождение - Маврикий) - Гематология

Параметр	Пол	n	1%	5%	50%	95%	99%	Среднее	Ст. откл.
НСТ	М	1495	0,385	0,401	0,443	0,488	0,512	0,4435	0,02776
	F	1426	0,376	0,399	0,442	0,489	0,508	0,4424	0,02947
Гемоглобин	М	1495	11,4	12,1	13,3	14,5	15,1	13,31	0,769
	F	1426	11,2	11,9	13,2	14,5	15,1	13,21	0,855
RBC	М	1495	5,67	6,04	6,74	7,51	7,92	6,744	0,4792
	F	1426	5,58	5,96	6,71	7,45	7,73	6,707	0,4894
Ретикулоциты (1) %	М	20	0,1	0,1	0,4	1,8	1,8	0,48	0,438
	F	20	0,1	0,1	0,3	0,9	0,9	0,42	0,268
Ретикулоциты (2) %	М	1476	0,21	0,27	0,49	0,95	1,58	0,551	0,3804
	F	1408	0,22	0,28	0,54	1,06	1,60	0,595	0,2934
MCH	М	1495	17,0	17,8	19,8	21,6	22,5	19,80	1,432
	F	1425	16,7	17,7	19,7	21,8	22,6	19,74	1,216
MCHC	М	1495	27,2	28,2	30,1	31,9	32,7	30,06	1,801
	F	1425	27,0	27,9	29,9	31,8	32,6	29,88	1,174
MCV	М	1495	57,9	60,5	65,8	71,4	73,5	65,88	3,278
	F	1425	58,3	60,4	66,0	71,7	74,5	66,07	3,353
RDW	М	280	12,6	12,9	14,4	16,1	16,7	14,40	0,934
	F	285	12,4	12,8	14,2	15,7	16,3	14,21	0,879
WBC	М	1507	5,61	6,62	10,52	18,59	30,24	11,372	4,7766
	F	1432	5,39	6,58	10,62	19,55	28,79	11,637	4,7307
Нейтрофилы	М	1507	0,88	1,28	3,49	10,24	16,27	4,319	3,1741
	F	1432	1,06	1,62	4,45	12,27	17,41	5,392	3,4777
Лимфоциты	М	1507	2,19	2,96	5,53	9,81	15,91	6,021	3,4066
	F	1432	2,16	2,67	4,86	8,55	13,95	5,265	2,9997
Эозинофилы	М	1507	0,00	0,01	0,17	0,81	1,49	0,254	0,3127
	F	1432	0,00	0,01	0,14	0,73	1,55	0,232	0,3188
Базофилы	М	1507	0,01	0,02	0,04	0,10	0,25	0,053	0,0627
	F	1432	0,01	0,02	0,04	0,10	0,21	0,051	0,0540
Моноциты	М	1507	0,17	0,25	0,51	1,03	1,45	0,562	0,2575
	F	1432	0,16	0,23	0,49	1,04	1,56	0,547	0,2705
Большие неокрашенные клетки	М	1507	0,04	0,06	0,14	0,32	0,60	0,163	0,1330
	F	1432	0,04	0,06	0,13	0,29	0,50	0,148	0,1147
Тромбоциты	М	1495	158	238	359	497	575	362,1	81,69

Параметр	Пол	n	1%	5%	50%	95%	99%	Среднее	Ст. откл.
	F	1426	181	234	359	496	560	360,5	80,04
PT	M	1481	9,6	9,9	10,8	12,0	14,8	10,88	0,877
	F	1406	9,7	10,0	10,8	12,1	14,1	10,93	0,847
Act PTT	M	1483	23,1	24,4	29,1	37,9	50,1	30,06	5,267
	F	1408	22,8	24,4	29,4	37,4	47,2	30,19	5,185
Фибриноген	M	265	1,61	1,86	2,61	3,51	4,88	2,664	0,6178
	F	252	1,58	1,84	2,43	3,27	3,89	2,487	0,4545

НСТ - гематокрит

RBC – красная кровяная клетка

MCH - среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC - средняя концентрация гемоглобина в эритроците

MCV - средний объем клетки

RDW – сухая масса ретикулоцитов

WBC - Лейкоциты

PT - протромбиновое время

Act PTT - активированное частичное тромбопластиновое время

Совокупные индивидуальные значения биохимического анализа для обезьян представляют с табл. 33а-h, ниже:

Таблица 33а

Животное номер	Группа/пол	Код случая	ALP ед./л	ALT ед./л	AST ед./л	Билир мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Креатинин мкмоль/л	Глюкоза ммоль/л	Холест. ммоль/л
615	1М	PT	740	36	39	3	5,35	69	3,65	2,34
		D11	743	35	33	3	5,43	73	3,66	2,00
		TERM	597	29	31	2	5,16	76	3,74	2,30
465	2М	PT	647	44	33	3	5,73	70	4,69	2,50
		PD	775	47	36	2	3,60	73	4,50	2,72
		D11	655	74	46	5	4,34	74	3,35	2,64
		TERM	768	48	38	3	4,42	73	3,67	2,54
639	2М	PD	741	29	26	2	4,41	87	3,31	3,22
		D11	629	29	28	3	3,87	99	2,64	2,99
		TERM	599	34	22	2	3,62	83	3,46	2,45
613	3М	PT	1003	37	31	5	3,80	90	5,72	2,61
		D11	793	36	29	4	4,45	80	3,28	2,70
		TERM	931	34	32	5	5,16	83	2,78	2,46
631	4М	PD	590	34	37	2	3,43	83	3,92	2,49
		D11	508	38	36	3	3,33	82	3,38	2,30
		TERM	578	25	25	2	4,00	89	3,70	2,26

ALP – щелочная фосфатаза

ALT – аланин-аминотрансфераза

AST - аспартат-аминотрансфераза

Таблица 33б

Животное номер	Группа/ пол	Код случая	Триглицериды ммоль/л	Na ммоль/л	K ммоль/л	Cl ммоль/л	Ca ммоль/л	Фосфаты ммоль/л	Общий белок г/л	Альбумин г/л
615	1М	PT	0,24	146	4,7	108	2,54	1,77	91	35
		D11	0,39	145	3,9	106	2,55	1,85	94	41
		TERM	0,34	147	4,2	107	2,47	1,63	87	38
465	2М	PT	0,74	147	3,7	108	2,71	1,32	81	37
		PD	0,93	147	4,1	109	2,70	1,54	84	46
		D11	0,66	151	3,9	111	2,70	1,98	83	39
		TERM	0,51	146	3,6	105	2,67	1,85	80	40
639	2М	PD	0,27	146	4,2	107	2,68	1,85	84	44
		D11	0,32	150	4,8	108	2,81	2,07	85	42
		TERM	0,38	146	4,5	107	2,70	2,03	74	39
613	3М	PT	0,47	151	4,5	106	2,75	1,85	83	41
		D11	0,44	147	4,2	106	2,69	1,76	80	45
		TERM	0,69	147	4,3	106	2,63	1,62	76	40
631	4М	PD	0,45	149	4,2	107	2,67	2,00	87	46
		D11	0,77	151	5,0	112	2,68	2,00	84	39
		TERM	0,64	150	4,7	107	2,77	1,89	86	46

Таблица 33в

Животное номер	Группа /пол	Код случая	a1 г/л	a2 г/л	β-глоб г/л	γ г/л	Соотн. A/G	Альб. %	a1 %	a2 %
615	1М	PT	3	5	25	23	0,63	39,0	3,4	5,1
		D11	3	4	22	25	0,77	43,1	3,0	4,5
		TERM	3	4	21	21	0,78	43,5	3,3	4,9
465	2М	PT	4	5	22	13	0,84	45,7	4,5	5,9
		PD	3	4	18	12	1,21	54,9	3,6	5,0
		D11	4	5	20	15	0,89	46,7	4,9	6,4
		TERM	3	5	20	11	1,00	50,5	4,0	5,8
639	2М	PD	3	5	17	14	1,10	52,9	3,5	5,8
		D11	3	6	18	16	0,98	49,1	4,1	6,6
		TERM	3	4	17	11	1,11	52,2	3,7	6,0
613	3М	PT	4	4	20	14	0,98	49,5	5,0	4,7
		D11	3	3	17	13	1,29	55,8	3,7	3,7

Животное номер	Группа /пол	Код случая	a1 г/л	a2 г/л	β-глоб г/л	γ г/л	Соотн. A/G	Альб. %	a1 %	a2 %
		TERM	3	3	15	14	1,11	53,0	4,6	3,9
5 631	4М	PD	3	4	18	16	1,12	53,3	3,6	4,3
		D11	4	4	19	18	0,87	46,4	4,4	4,4
		TERM	3	4	19	15	1,15	53,1	3,4	4,3

Таблица 33г

Животное номер	Группа /пол	Код случая	β %	Г %
15 615	1М	PT	27,3	25,3
		D11	23,2	26,2
		TERM	24,4	23,9
20 465	2М	PT	27,4	16,6
		PD	21,8	14,7
		D11	24,0	17,9
		TERM	25,5	14,2
25 639	2М	PD	20,7	17,0
		D11	21,5	18,7
		TERM	23,2	14,9
30 613	3М	PT	24,5	16,3
		D11	21,0	15,8
		TERM	20,0	18,5
631	4М	PD	20,7	18,0
		D11	22,8	22,0
		TERM	22,1	17,1

Таблица 33д

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	ALP ед./л	ALT ед./л	AST ед./л	Билир мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Креати- нин мкмоль/л	Глюкоза ммоль/л	Холест. ммоль/л
35 614	1F	PT	687	71	50	3	4,92	60	4,45	2,77
		D11	576	63	44	2	5,22	63	4,32	2,73
		TERM	517	59	41	3	4,78	70	3,98	2,83
40 652	1F	PT	598	43	25	3	7,26	69	3,26	2,42
		D11	540	40	28	3	6,94	78	3,28	2,46
		TERM	511	40	27	4	6,78	80	3,46	2,38
45 624	2F	PD	533	56	35	3	3,85	73	3,91	2,31
		D11	410	40	34	13	4,18	78	2,72	2,56
		TERM	432	41	25	3	3,70	78	3,30	2,16
632	3F	PT	559	35	34	5	5,44	80	3,08	2,47
		D11	510	37	31	5	4,36	85	3,89	2,61

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	ALP ед./л	ALT ед./л	AST ед./л	Билир мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Креати- нин мкмоль/л	Глюкоза ммоль/л	Холест. ммоль/л
		TERM	428	37	34	5	5,32	88	3,10	2,63
5 640	4F	PD	343	23	32	4	4,09	65	3,46	1,24
		D11	292	25	28	4	4,12	63	2,69	1,13
		TERM	266	22	27	2	4,55	69	3,69	1,00

Таблица 33е

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Триглице- риды ммоль/л	Na ммоль/л	K ммоль/л	Cl ммоль/л	Ca ммоль/л	Фосфат ммоль/л	Общий белок г/л	Альбум г/л
15 614	1F	PT	0,37	148	4,6	109	2,69	2,03	80	39
		D11	0,33	147	4,1	109	2,72	2,08	82	43
		TERM	0,54	148	3,6	108	2,59	1,84	80	41
20 652	1F	PT	0,57	147	4,3	105	2,58	1,52	78	35
		D11	0,43	149	4,7	108	2,74	1,80	88	43
		TERM	0,59	149	4,4	108	2,59	1,51	80	40
25 624	2F	PD	0,60	145	4,1	108	2,54	1,50	77	40
		D11	0,51	148	4,0	111	2,58	1,42	77	39
		TERM	0,43	146	3,9	108	2,56	1,46	76	44
30 632	3F	PT	0,31	151	4,5	109	2,48	1,72	76	34
		D11	0,34	149	4,6	109	2,58	1,85	80	39
		TERM	0,49	150	4,5	111	2,55	1,47	78	38
30 640	4F	PD	0,36	144	4,8	111	2,31	1,45	68	29
		D11	0,31	145	4,3	112	2,24	1,53	63	25
		TERM	0,27	144	4,7	108	2,20	1,33	60	25

Таблица 33ж

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	a1 г/л	a2 г/л	β г/л	γ г/л	Соотн. A/G	Альбумин %	a1 %	a2 %
40 614	1F	PT	4	5	20	13	0,95	49,2	4,4	5,9
		D11	3	4	19	13	1,10	52,7	3,3	4,9
		TERM	3	4	18	13	1,05	51,7	3,8	5,2
45 652	1F	PT	4	5	19	15	0,81	45,1	4,6	5,9
		D11	3	5	20	17	0,96	49,3	3,4	5,5
		TERM	4	5	18	14	1,00	49,4	4,7	6,2
50 624	2F	PD	3	4	16	14	1,08	52,2	4,1	5,4
		D11	4	4	17	14	1,03	50,1	4,9	5,5
		TERM	3	4	15	10	1,38	58,5	3,4	5,3

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	a1 г/л	a2 г/л	β г/л	γ г/л	Соотн. A/G	Альбумин %	a1 %	a2 %
5	3F	PT	4	4	19	15	0,81	44,7	5,1	5,0
		D11	3	4	17	16	0,95	49,2	4,2	4,7
		TERM	4	4	17	15	0,95	49,2	4,6	4,9
10	4F	PD	4	4	17	15	0,74	42,2	5,7	5,6
		D11	4	3	17	13	0,66	40,1	6,6	5,5
		TERM	4	3	16	13	0,71	41,4	6,4	4,6

Таблица 33з

Животное Номер	Группа /Пол	Код случая	β %	Г %
15	1F	PT	24,8	15,7
		D11	23,1	16,0
		TERM	22,8	16,5
20	1F	PT	24,7	19,7
		D11	22,3	19,4
		TERM	22,1	17,6
25	2F	PD	20,7	17,6
		D11	21,6	18,0
		TERM	19,9	12,9
30	3F	PT	24,9	20,2
		D11	21,5	20,4
		TERM	21,8	19,5
35	4F	PD	24,9	21,6
		D11	26,9	20,9
		TERM	26,5	21,1

Гематологические совокупные индивидуальные значения для обезьян
представляют в табл. 34а-1, ниже:

Таблица 34а

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Гематок. л/л	Гемогл г/дл	Красные клетки крови $\times 10^{12}/л$	Ретикуло циты %	MCH пг	MCHC г/дл	MCV фл
40	1M	PT	0,389	12,4	5,94	0,38	20,9	31,9	65,5
		D11	0,366	11,5	5,59	0,76	20,6	31,4	65,5
		TERM	0,381	11,8	5,91	0,25	20,0	31,0	64,5
45	2M	PT	0,439	13,2	6,76	0,56	19,5	30,1	65,0
		PTR							
		PD	0,460	13,7	7,22	0,50	19,0	29,9	63,8

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Гематок. л/л	Гемогл г/дл	Красные клетки крови $\times 10^{12}/л$	Ретикуло циты %	MCH пг	MCHC г/дл	MCV фл
5		D11	0,391	11,7	6,11	1,62	19,1	29,9	64,0
		TERM	0,441	13,6	6,93	0,65	19,7	30,9	63,7
10	2М	PD	0,419	12,7	6,23	0,51	20,4	30,3	67,2
		D11	0,400	11,7	5,99	0,52	19,6	29,3	66,7
		TERM	0,388	12,2	5,70	1,14	21,4	31,4	68,1
15	3М	PT	0,461	14,1	6,79	0,48	20,7	30,5	67,8
		PTR							
		D11	0,396	12,7	6,05	0,92	21,0	32,1	65,4
		TERM	0,410	12,9	6,23	0,49	20,8	31,5	65,9

Таблица 34б

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Бел. кл. крови $\times 10^9/L$	Нейтроф $\times 10^9/L$	Лейкоц $\times 10^9/L$	Эозин. $\times 10^9/L$	Базоф. $\times 10^9/L$	Моноц. $\times 10^9/L$	LUC $\times 10^9/L$	Тромб. $\times 10^9/L$
20	1М	PT	7,57	3,06	3,68	0,06	0,03	0,53	0,20	236
		D11	7,56	2,78	4,35	0,06	0,02	0,21	0,13	284
		TERM	7,93	3,77	3,52	0,06	0,02	0,49	0,07	254
25	2М	PT	14,19	1,78	10,37	1,24	0,05	0,55	0,20	302
		PTR	13,69	3,69	8,25	0,93	0,04	0,47	0,29	
		PD	13,36	1,55	9,95	1,01	0,04	0,58	0,25	325
		D11	12,26	4,70	5,63	1,27	0,04	0,51	0,11	403
		TERM	15,45	1,54	11,57	1,65	0,07	0,42	0,20	356
30	2М	PD	10,02	5,21	3,42	0,90	0,01	0,39	0,10	306
		D11	8,26	4,06	2,47	1,17	0,01	0,45	0,10	371
		TERM	8,70	2,55	4,20	1,04	0,02	0,80	0,09	253
35	3М	PT	20,21	12,99	6,45	0,02	0,04	0,50	0,21	438
		PTR	16,85	8,87	6,90	0,08	0,06	0,67	0,26	
		D11	10,85	6,11	4,15	0,03	0,02	0,41	0,12	441
		TERM	23,26	17,70	4,27	0,05	0,04	1,11	0,08	434

Таблица 34в

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	РТ сек.	АРТТ сек.
45	1М	PT	11,3	37,3
		D11	10,3	32,7
		TERM	11,3	33,3
50	2М	PT	10,0	33,9

5

10

			PTR		
			PD	9,9	26,1
			D11	10,0	31,6
			TERM	10,2	29,4
	639	2M	PD	10,6	22,6
			D11	10,5	26,3
			TERM	10,3	28,9
	613	3M	PT	10,3	35,5
			PTR		
			D11	11,4	26,7
			TERM	10,3	30,8

Таблица 34г

15

20

25

30

35

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Анизоцитоз	Микроцитоз	Макроцитоз	Гипохромазия	Гиперхромазия
615	1M	PT	-	-	-	-	+
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	+
465	2M	PT	-	-	-	-	-
		PTR					
		PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
639	2M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
613	3M	PT	-	-	-	-	-
		PTR					
		D11	-	-	-	-	+
		TERM	-	-	-	-	-

Таблица 34д

40

45

50

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Гематокр. л/л	Гемогл. г/дл	Красные клетки крови $\times 10^{12}/л$	Ретикулоц иты %	MCH Пг	MCHC г/дл	MCV Фл
631	4M	PD	0,460	13,6	7,11	0,43	19,1	29,5	64,6
		D11	0,395	11,9	6,36	0,45	18,7	30,2	62,1
		TERM	0,449	13,7	6,97	0,30	19,6	30,5	64,4
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR							
		D11	0,404	13,1	6,33	0,57	20,6	32,3	63,8
		TERM	0,424	13,0	6,59	0,68	19,7	30,7	64,3

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Гематокр. л/л	Гемогл. г/дл	Красные клетки крови $\times 10^{12}/л$	Ретикулоц иты %	MCH Пг	MCHC г/дл	MCV Фл
5	652	1F	PT	0,390	11,3	5,72	1,15	19,8	68,2
			D11	0,374	11,9	5,55	1,06	21,4	67,4
			TERM	0,384	11,5	5,71	0,58	20,2	67,2
10	624	2F	PD	0,407	11,8	7,14	0,73	16,6	57,1
			D11	0,377	10,8	6,69	0,48	16,1	56,3
			TERM	0,401	11,7	6,99	1,07	16,7	57,4

Таблица 34е

15	Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Белые клетки крови ×10 ⁹ /L	Нейтрофилы ×10 ⁹ /л	Лейкоциты ×10 ⁹ /L	Эозинофилы ×10 ⁹ /л	Базофилы ×10 ⁹ /л	Моноциты ×10 ⁹ /л	LUC ×10 ⁹ /л	Тромбоциты ×10 ⁹ /л		
	631	4M	PD	10,53	2,82	6,36	0,62	0,02	0,58	0,13	378		
			D11	7,97	2,86	3,81	0,61	0,01	0,53	0,16	424		
			TERM	8,08	1,73	5,04	0,63	0,02	0,60	0,05	384		
20	614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD		
			PTR	11,32	3,47	6,36	0,17	0,05	0,96	0,31			
			D11	9,70	4,74	3,73	0,09	0,02	0,84	0,28	429		
25			TERM	9,64	3,65	5,09	0,13	0,01	0,62	0,13	414		
			652	1F	PT	10,66	3,21	6,05	0,42	0,03	0,80	0,15	373
					D11	12,01	5,53	5,20	0,34	0,02	0,78	0,13	380
TERM	11,88	7,59			3,24	0,35	0,02	0,61	0,08	338			
30	624	2F	PD	9,06	3,10	5,02	0,41	0,02	0,33	0,18	362		
			D11	7,82	5,14	2,06	0,14	0,02	0,34	0,13	353		
			TERM	11,69	4,33	5,46	0,96	0,02	0,76	0,16	426		

Таблица 34ж

35	Животное номер	Группа /Пол	Код случая	PT, сек.	APTT, сек.
40	631	4M	PD	10,9	29,3
			D11	11,3	27,9
			TERM	10,8	32,1
	614	1F	PT	CTD	CTD
			PTR		
			D11	10,2	32,1
TERM			10,5	29,3	
45	652	1F	PT	10,2	33,0
			D11	9,6	27,9
			TERM	10,3	30,3

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	РТ, сек.	АПТТ, сек.
624	2F	PD	10,6	27,1
		D11	10,6	29,7
		TERM	10,8	33,3

Таблица 34з

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Анизоцитоз	Микроцитоз	Макроцитоз	Гипохро- мазия	Гиперхро- мазия
631	4M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR					
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
652	1F	PT	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
624	2F	PD	-	+	-	-	-
		D11	-	+	-	-	-
		TERM	+	+	-	-	-

Таблица 34и

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Гематок л/л	Гемогл г/дл	Красные клетки крови $\times 10^{12}/л$	Ретикуло циты %	МСН пг	МСНС г/дл	MCV фл
632	3F	PT	0,416	12,4	6,36	0,83	19,6	29,9	65,4
		PTR	0,410	12,2	6,29	0,64	19,5	29,8	65,3
		D11	0,392	12,2	6,19	0,73	19,7	31,0	63,4
		TERM	0,412	12,3	6,46	0,55	19,1	29,9	63,8
640	4F	PD	0,398	11,8	5,81	0,95	20,3	29,7	68,5
		D11	0,369	11,0	5,30	1,17	20,7	29,8	69,6
		TERM	0,401	11,9	5,58	0,83	21,3	29,6	71,9

Таблица 34к

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Белые клетки крови $\times 10^9 / \text{л}$	Нейтр. $\times 10^9 / \text{л}$	Лейкоц. \times $10^9 / \text{л}$	Эозин. $\times 10^9 / \text{л}$	Базоф.	Моноц.	LUC $\times 10^9 / \text{л}$	Тромб. $\times 10^9 / \text{л}$
632	3F	PT	18,12	10,58	5,61	1,07	0,04	0,61	0,21	335
		PTR	15,16	5,99	7,24	0,95	0,03	0,63	0,31	308
		D11	10,23	4,69	4,15	0,66	0,01	0,48	0,23	348
		TERM	13,04	6,89	4,62	0,44	0,03	0,93	0,13	321
640	4F	PD	12,49	8,29	2,91	0,46	0,02	0,64	0,17	567
		D11	13,71	10,31	2,18	0,34	0,01	0,74	0,12	578
		TERM	11,49	5,41	4,18	0,63	0,03	1,12	0,12	555

Таблица 34л

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	PT сек.	APTT сек.
632	3F	PT	10,6	47,8
		PTR	10,6	44,7
		D11	10,2	33,1
		TERM	10,6	37,2
640	4F	PD	12,0	25,8
		D11	12,4	28,0
		TERM	12,8	30,1

Таблица 34м

Животное номер	Группа /Пол	Код случая	Анизо- цитоз	Микро- цитоз	Макро- цитоз	Гипохро- мазия	Гиперхро- мазия
632	3F	PT	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
640	4F	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Микроскопическая патология – факторы, обнаруженные с связи с лечением
 Перихолангит (воспаление соединительной ткани вокруг желчного
 протока) описан у самки обезьяны, получающей дозу 12 мг/кг/день, но
 отсутствует у каких-либо других самок или самцов обезьян. Данный факт может
 быть связан с лечением Глико-mAb (антителом к EGFR), но при таких маленьких

количества животных значимость недостоверна. Все другие обнаруженные факты считают случайными и не имеющими токсикологической важности.

Макропатология и гистопатология

Итоги гистопатологического исследования всех тестируемых животных приводят в табл. 35 ниже:

Таблица 35

Гистопатология -- группа распределения и тяжести обнаруженных фактов для всех животных

Группа	1	2	3
Соединение	-ГЛИКО-МАВ (Антитело к EGFR)-		
Доза	1,5	4,5	12

		Число пораженных животных					
		Пол			Самцы		
		Самцы			Самки		
	Группа	1	2	3	1	2	3
Исследуемый орган/ткань	Число	1	1	1	1	1	1
Толстая кишка	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Сердце	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Почки	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Кортикальная лимфоцитарная инфильтрация	Минимальная	1	1	0	0	1	1
	Слабая	0	0	0	1	0	[?]
	Общая	1	1	0	1	1	1
Левая головная	Исследуемый No.	0	0	0	0	0	0
Левая подкожная	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
- Эпидермальная гиперплазия	Минимальная	0	0	0	1	0	0
	Общая	0	0	0	1	0	0
Печень - Очаги воспалительных клеток	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
	Минимальная	1	1	1	1	1	1
	Общая	1	1	1	1	1	1
- Прролиферация желчных протоков	Минимальная	0	0	0	0	0	1
	Общая	0	0	0	0	0	1
- Вакуолизация гепатоцитов Срединная щель	Минимальная	0	1	0	0	0	0
	Общая	0	1	0	0	0	0
- Перихолангит	Минимальная	0	0	0	0	0	1
	Общая	0	0	0	0	0	1
Легкие и Бронхи	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
- Бронхи/Бронхиолы -- Воспалительные клетки слизистых/подслизистых тканей	Слабая	1	0	0	0	0	0
	Общая	1	0	0	0	0	0
- Альвеолярные макрофаги	Минимальная	0	1	0	0	0	1
	Общая	0	1	0	0	0	1

	Пол	Число пораженных животных					
		Самцы			Самки		
		1	2	3	1	2	3
Исследуемый орган/ткань	Группа	1	1	1	1	1	1
5 - Периваскулярные воспалительные/лимфоидные клетки	Минимальная	0	0	1	0	0	1
	Общая	0	0	1	0	0	1
- Лимфоидные агрегаты	Минимальная	0	0	1	0	0	0
	Общая	0	0	1	0	0	0
10 Пищевод	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
- Лимфоидные агрегаты	Минимальная	0	0	0	0	0	1
	Общая	0	0	0	0	0	1
Яичники	Исследуемый No.	0	0	0	1	1	1
15 - Фолликулярная киста(ы)	Имеется	0	0	0	1	0	0
	Общая	0	0	0	1	0	0
- Вступающее желтое тело	Имеется	0	0	0	0	1	0
	Общая	0	0	0	0	1	0
Поджелудочная железа	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
20 - Ацинарная атрофия	Минимальная	0	0	1	1	0	1
	Общая	0	0	1	1	0	1
- Лимфоидные агрегаты	Минимальная	0	0	0	1	0	0
	Общая	0	0	0	1	0	0
Правая головная	Исследуемый No.	0	0	0	0	0	0
25 Правая подкожная	Исследуемый No.	0	0	0	0	0	0
Кожа (Протокол)	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Эпидермальная гиперплазия	Минимальная	0	0	0	0	0	1
30	Средняя	0	0	0	1	0	0
	Общая	0	0	0	1	0	1
Спинной мозг	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
- Кровотечение	Минимальное	0	0	1	1	1	1
35	Слабое	0	1	0	0	0	0
	Общее	0	1	1	1	1	1
Селезенка	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Грудина и костный мозг	Исследуемый No.	0	0	0	0	0	0
40 Желудок	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Яички	Исследуемый No.	1	1	1	0	0	0
- Незрелость	Имеется	1	1	1	0	0	0
	Общая	1	1	1	0	0	0
45 Тимус	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
- Киста(ы)	Имеется	0	0	0	0	1	0
	Общая	0	0	0	0	1	0
- Инволюция/Атрофия	Минимальная	0	0	0	0	1	0
	Общая	0	0	0	0	1	0
50							

		Число пораженных животных					
		Самцы			Самки		
		1	2	3	1	2	3
Исследуемый орган/ткань	Группа	1	1	1	1	1	1
Мочевой пузырь	Исследуемый No.	1	1	1	1	1	1
Шейка матки	Исследуемый No.	0	0	0	1	1	1
- Эпителиальное образование слизи	Имеется	0	0	0	1	1	1
	Общая	0	0	0	1	1	1
Матка	Исследуемый No.	0	0	0	1	1	1
- Застой	Минимальная	0	0	0	0	1	0
	Общая	0	0	0	0	1	0
Слепая кишка	Исследуемый No.	1	0	0	1	0	0
- Выступающая подслизистая жировая ткань	Минимальная	1	0	0	1	0	0
	Общая	1	0	0	1	0	0
Фаллопиева труба	Исследуемый No.	0	0	0	1	1	1
Лимфоузел брыжейки	Исследуемый No.	0	0	0	1	0	0
- Макрофаги с повышенной пигментацией	Слабая	0	0	0	1	0	0
	Общая	0	0	0	1	0	0

Отдельные факты для всех животных

Наблюдения патологии у отдельных животных приводят в табл. 36 ниже:

Таблица 36

Макропатология и гистопатология – отдельные наблюдения для всех животных

Группа	1	2	3
Соединение	-Глико-MAb (Антитело к EGFR)-		
Доза	1,5	4,5	12

Наблюдения патологии

Пол	Мужской	Группа дозы	1
Животное No.	0623	Исследование за неделю до умерщвления	11
Терминальная масса тела	2715,0 г	Исследование за день до умерщвления	77
Результаты вскрытия		Данные гистопатологии	
Слепая кишка:		Слепая кишка:	
- Выпуклая область(и); аспект слизистых, множество, до 3 мм.		- Выступающая подслизистая жировая ткань - Минимальная, очаговая	
Толстая кишка:		Толстая кишка:	

- Выпуклая область(и); аспект слизистых, множество, до 2 мм.		Существенное поражение отсутствует	
		Почки:	
		-Кортикальная лимфоцитарная инфильтрация,-Минимальная	
Печень:		Печень:	
- Бледная область(и) срединной щели; одна, субкапсулярная, 3 мм.		- Очаги воспалительных клеток – Минимальные	
		Легки и бронхи:	
		- Бронхи/бронхиолы Воспалительные клетки слизистых/подслизистых - Слабые	
Желудок:		Желудок:	
- Выпуклая область(и) тела желудка; Слизистая, одна около привратниковой пещеры, 3 мм.		> существенное поражение отсутствует	
		Яички:	
		- Незрелость – Имеется	
Пол	Мужской	Группа дозы	2
Животное No.	0461	Исследование за неделю до умерщвления	18
Терминальная масса тела	2573,0 г	Исследование за день до умерщвления	125
Результаты вскрытия		Данные гистопатологии	
		Почки	
		-Кортикальная лимфоцитарная инфильтрация, -Минимальная	
Печень:		Печень	
- Бледная область(и) срединной щели; одна, субкапсулярная, 4 мм.		- Очаги воспалительных клеток – Минимальные Вакуолизация гепатоцитов – Срединная щель - минимальная	
Легкие и бронхи:		Легкие и бронхи:	
- Неполный коллапс; Правые доли.		-Альвеолярные макрофаги – Минимальные	
		Спинной мозг:	
		-Кровотечение - Слабое, многоочаговое	
		Яички:	
		-Незрелость – Имеется	
Пол	Мужской	Группа дозы	3
Животное No.	0463	Исследование за неделю до умерщвления	18
Терминальная масса тела	2919,0 г	Исследование за день до умерщвления	125
Результаты вскрытия		Данные гистопатологии	
		Печень:	
		- Очаги воспалительных клеток – Минимальные	
		Легкие и бронхи:	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

		- Периваскулярные воспалительные/лимфоидные клетки - Минимальные	
		-Лимфоидные агрегаты-Минимальные, Очаговые	
		Поджелудочная железа:	
		-Ацинарная атрофия-Минимальная, Очаговая	
		Спинной мозг:	
		-Кровотечение-Минимальное	
		Яички:	
		- Незрелость – Имеется	
Животное не имеет зарегистрированных результатов макроскопических исследований			
Пол	Самки	Группа дозы	1
Животное No.	0590	Исследование за неделю до умерщвления	11
Терминальная масса тела	3176,0 г	Исследование за день до умерщвления	77
Результаты вскрытия		Данные гистопатологии	
Слепая кишка:		Слепая кишка :	
- Выпуклая область(и); аспект слизистых, множество, до 2 мм.		- Выступающая подслизистая жировая ткань - Минимальная, многоочаговая	
Толстая кишка:		Толстая кишка:	
- Выпуклая область(и); аспект слизистых, множество, до 2 мм.		> Отсутствие существенного поражения	
		Почки :	
		-Кортикальная лимфоцитарная инфильтрация,-Слабая, Очаговая	
		Левая подкожная:	
		-Эпидермальная гиперплазия-Минимальная	
Печень:		Печень :	
- Бледная область(и) срединной щели; Одна, субкапсулярная, 3 мм.		-Очаги воспалительных клеток-Минимальная	
Лимфоузел брыжейки:		Лимфоузел брыжейки:	
- Застойный, Минимально		- Макрофаги с повышенной пигментацией – Слабая выраженность	
Яичники:		Яичники :	
- Киста(ы); левая, одна, наполненная прозрачной жидкостью, 4 мм.		- Фолликулярная киста(ы) – имеется	
		Поджелудочная железа :	
		-Ацинарная атрофия-Минимальная	
		-Лимфоидные агрегаты-Минимальная	
		Кожа (Протокол) :	
		-Эпидермальная гиперплазия-Умеренная	
		Спинной мозг:	
		-Кровотечение-Минимальное	
Селезенка:		Селезенка:	
- Капсула утолщенная; Область, диффузная.		> Существенное поражение отсутствует	
		Шейка матки:	
		- Ослизненение эпителия – Имеется	
Пол	Самки	Dose Группа	2

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Животное No.	0462	Исследование за неделю до умерщвления	18
Терминальная масса тела	2910,0 г	Исследование за день до умерщвления	125
Результаты вскрытия		Данные гистопатологии	
		Почки :	
		-Кортикальная лимфоцитарная инфильтрация,-Минимальная, Очаговая	
		Печень :	
		-Очаги воспалительных клеток- Минимальная	
Легкие и бронхи:		Легкие и бронхи :	
-Неполный коллапс; Левые доли.		Существенное поражение отсутствует	
Яичники:		Яичники :	
- Выпуклая область(и); одна на каждом, на левом – 3 мм, на правом – 2 мм (фолликулы)		- Выступающее желтое тело – Имеется	
		Спинной мозг :	
		-Кровотечение-Минимальное	
Тимус:		Тимус:	
- Маленький; 1,066 г.		- Киста(ы) – имеются	
		- Инволюция/атрофия – Минимальная	
		Шейка матки :	
		- Ослизнение эпителия – Имеется	
Матка:		Матка:	
- Застойные явления, Минимальные		- Застой-Минимальный	
Пол	Самки	Группа дозы	3
Животное No.	0612	Исследование за неделю до умерщвления	18
Терминальная масса тела	2934,0 г	Исследование за день до умерщвления	125
Результаты вскрытия		Данные гистопатологии	
		Почки :	
		-Кортикальная лимфоцитарная инфильтрация,-Минимальная, Очаговая	
Печень:		Печень :	
- Бледная область(и) срединной щели; одна, субкапсулярная, 3 мм.		- Очаги воспалительных клеток - Минимальные	
- Киста(ы); В щели, одна, наполненная темной жидкостью, зеленая, 2 мм.		- Прлиферация желчных протоков - Минимальная	
		- Перихолангит – Минимальный	
Легкие и бронхи:		Легкие и бронхи :	
- Неполный коллапс; Левые доли.		- Альвеолярные макрофаги – Минимальная	
		- Периваскулярные воспалительные/лимфоидные клетки – Минимальные	
		Пищевод:	
		- Лимфоидные агрегаты –Минимальная	
		Поджелудочная железа :	
		- Ацинарная атрофия -Минимальная, Очаговая	
		Кожа (Протокол):	

	- Эпидермальная гиперплазия - Минимальная
	Спинной мозг :
	- Кровотечение -Минимальная
	Шейка матки :
	- Эпителиальное ослизнение – Имеется.

Индивидуальные массы тела обезьян макак-крабоед представляют в табл.

37, ниже:

Таблица 37: Массы тела: Индивидуальные значения

Животное №	Масса тела (кг) в День													Изменение массы тела (кг)	
	-17	-9	1*	8*	15*	22*	29	36	50	57	64	71	77	D 1 до 71	
														71	71
Группа 1: GA201-ge, 1,5 мг/кг/случай															
623m	2,67	2,65 (-0,02)	2,69 (+0,04)	2,72 (+0,03)	2,76 (+0,04)	2,62 (-0,14)	2,72 (+0,10)	2,65 (-0,07)	2,71 (+0,06)	2,73 (+0,02)	2,61 (-0,12)	2,74 (+0,13)	2,75 (+0,04)	+0,06	+0,03
590f	2,98	2,92 (-0,06)	2,97 (+0,05)	3,14 (+0,17)	3,13 (-0,01)	3,01 (-0,12)	3,06 (+0,05)	3,00 (-0,06)	3,19 (+0,19)	3,16 (-0,03)	3,11 (-0,05)	3,18 (+0,07)	3,23 (-0,04)	+0,27	+0,17
Группа 2: GA201-ge, 4,5 мг/кг/случай															
461m	2,50	2,56 (+0,06)	2,53 (-0,03)	2,47 (-0,06)	2,53 (+0,06)	2,53 NC	2,53 NC	2,61 (+0,08)	2,53 (-0,08)	2,45 (-0,08)	2,54 (+0,09)	2,60 (+0,06)		+0,03	+0,06
462f	2,87	2,96 (+0,09)	2,91 (-0,05)	2,82 (-0,09)	2,95 (+0,13)	2,89 (-0,06)	2,88 (-0,01)	2,79 (-0,09)	2,91 (+0,12)	2,95 (+0,04)	3,05 (+0,10)	3,02 (-0,03)		+0,05	+0,08
Группа 3: GA201-ge, 12 мг/кг/случай															
463m	2,69	2,81 (+0,12)	2,86 (+0,05)	2,74 (-0,12)	2,81 (+0,07)	2,81 NC	2,81 NC	2,81 NC	2,75 (-0,06)	2,71 (-0,04)	2,92 (+0,21)	2,98 (+0,06)		+0,23	+0,28
612f	2,84	2,96 (+0,12)	2,92 (-0,04)	2,98 (+0,06)	3,06 (+0,08)	3,01 (-0,05)	3,01 NC	2,94 (-0,07)	2,91 (-0,03)	2,81 (-0,10)	3,04 (+0,23)	3,05 (+0,01)		+0,18	+0,09

Заключения

Эффект лечения отсутствует в областях инъекции, и полагают, что никакие клинические проявления не связаны с лечением Глико-mAb (антителом к EGFR).
5 Изменения массы тела находятся в нормальных ожидаемых пределах. Полагают, что никакие проявления не связаны с лечением на уровне макроскопического исследования, и массы органов животных находятся в нормальных ожидаемых
10 пределах. В заключение, лечение при дозе 1,5, 4,5 или 12 мг/кг/случай хорошо переносится при отсутствии явных проявлений системной токсичности.

EGFR не является опухолеспецифической мишенью, поскольку присутствует на поверхности различных нормальных тканей, в том числе
15 печени, почки и кожи. Антитела к EGFR с Fc-участком IgG1 человека ранее вводили человеку, и они демонстрируют приемлемый профиль побочных эффектов (см. статьи Vanhoefer, U. et al., Clin. Oncol. 1 января 2004; 22(1):175-
20 84; Needle MN, Semin Oncol. 29 октября 2002, (5 Suppl 14):55-60). Несомненно, должны быть важные причины для введения человеку или другому млекопитающему антитела к EGFR с существенно повышенной ADCC
25 вследствие повышенной активности уничтожения, которая могла бы проявиться в отношении важных нормальных тканей, таких как печень, почка и кожа. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение такого антитела к EGFR, Fc-инженерного, как описано выше, и с повышенной до 1000
30 раз активностью ADCC при введении *in vivo* млекопитающим не вызывает существенной токсичности. Концентрации антитела поддерживают на уровне выше 1 мкг/мл в течение по меньшей мере 4 недель (и выше 100 мкг/мл для
35 некоторых животных). Данные уровни воздействия типичны для терапии антителами. Максимальная ADCC для антитела, представленного в данном исследовании, достигается уже при концентрации 1 мкг/мл. Введения
40 однократной дозы при дозах 40 и 100 мг антитела к EGFR (исходного крысиного антитела ICR62) людям с онкологическими заболеваниями показывают специфическую направленность на опухоли *in vivo* (см. статью Modjtahedi, H. et
45 al., Br J Cancer. 1996 Jan;73(2):228-35.). Эффекторные клетки обезьяны макак-крабод имеют высоко гомологичный рецептор FcγRIII и, как показывают, опосредуют повышенную ADCC с Fc-инженерными антителами (и с антителами, гликоинженерными с целью получения повышенных уровней
50

нефукозилированных олигосахаридов на Fc-участке). Повышение уровня ADCC очень близко к наблюдаемому с эффекторными клетками человека (PBMcs).

В итоге обнаружено, что антитело к EGFR, Fc-инженерное с целью получения повышенной аффинности связывания Fc-FcγRIII и повышенной ADCC, можно вводить млекопитающим, чтобы получить концентрации выше 1 мкг антитела/мл сыворотки в течение по меньшей мере 4 недель, чтобы обеспечить воздействия лекарственных препаратов, в норме связанные с существенной кумуляцией антитела на клетках-мишенях *in vivo*, не приводящие к существенной токсичности.

Токсичности антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем изобретении, можно измерить и/или определить с использованием любых способов и/или параметров (например, показателей биохимического анализа крови, гистопатологических показателей и т.п.), описанных выше в данном контексте, или любыми средствами, известными компетентным специалистам в области техники. Клинически существенный уровень токсичности в понимании компетентного специалиста в области техники, представляет собой уровень, который превосходит уровни, как правило, принятые Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для антител, применяемых в клинике.

Пример 5

Модификации CDR легкой цепи

Используя вышеописанные способы, генерируют варианты вариабельной области легкой цепи антитела к EGFR из конструкции вариабельной области легкой цепи I-KC (SEQ ID NO:43 и SEQ ID NO:45), в которой последовательность, кодирующая остаток аминокислоты в различных положениях в CDR крысиного ICR62 заменены соответствующим остатком аминокислоты из последовательности гена вариабельной области зародышевой линии человека. Табл. 38 показывает замены, которые сделаны в CDR конструкции вариабельной области легкой цепи I-KC (SEQ ID NO:45):

Таблица 38: Минимизированные CDR легкой цепи

Название конструкции	Замена аминокислоты, сделанная в SEQ ID NO:45	Легкая цепь CDR, в которой сделана замена
----------------------	---	---

I-KC1	N30R*	CDR1
I-KC2	Y32W	CDR1
I-KC3	N34G	CDR1
I-KC4	N50T	CDR2
I-KC5	T51A	CDR2
I-KC6	N52S	CDR2
I-KC7	N53S	CDR2
I-KC8	T56S	CDR2
I-KC9	F94Y	CDR3

* Идентифицированы в соответствии со стандартной номенклатурой (например, "N30R" означает, что остаток аспарагина (N) в положении 30 SEQ ID NO:45 заменен остатком аргинина (R)).

Все идентифицированные выше замененные остатки выделены из акцепторной последовательности человеческого VK1_6 за исключением замены Y32W, в которой W соответствующей последовательности зародышевой линии человека заменено Y в положении 32 в SEQ ID NO:45.

Каждый из вариантов конструкций I-KC (I-KC1 - I-KC9) спаривают с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей конструкцию I-NHD (SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:15) и проводят анализ связывания согласно способам, описанным в предшествующих примерах. Конструкции I-KC1 - I-KC9 сравнивают с конструкцией I-KC (SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:45) в плане аффинности связывания с EGFR в клетках-мишенях A431 (см. фиг. 29). Как видно на фиг. 29, только модификация остатка 34 до его соответствующей человеческой последовательности (N34G) приводит в результате незначительному снижению аффинности связывания (значение EC50 повышено на коэффициент 10). Все другие конструкции сохраняют активность связывания, сравнимую с активностью конструкции I-KC (SEQ ID NO:45). Вследствие этого при спаривании с химерной (например, гуманизированной) конструкцией тяжелой цепи, специфической в отношении EGFR, легкая цепь может быть полностью человеческой (например, из последовательности V-гена легкая цепь человека) и все еще сохраняет специфическое связывание в отношении EGFR. В частности, CDR2 и CDR3 могут быть полностью в форме зародышевой линии человека.

Антигенсвязывающие молекулы, включающие EGFR-специфические CDR

Настоящее изобретение, таким образом, представляет антигенсвязывающую молекулу, включающую химерную (например, гуманизированную) переменную область тяжелой цепи, включающую EGFR-специфические CDR, спаренные с переменной областью легкой цепи, причем переменная область легкой цепи имеет меньше десяти остатков аминокислот нечеловека. В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи имеет меньше девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех, трех, двух или одного остатка аминокислот нечеловека. В предпочтительных вариантах осуществления переменная область легкой цепи имеет меньше двух или меньше одного (т.е. ни одного) остатка аминокислот нечеловека. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает одну или более последовательностей гена переменной области зародышевой линии человека. Последовательности гена переменной области зародышевой линии человека, кодирующие переменные области легкой цепи, известны в области техники и могут быть обнаружены, например, в базе данных IMGT, доступной на <http://imgt.cines.fr/chac.ome.html>. В предпочтительном варианте осуществления последовательность зародышевой линии человека, выделенную из последовательности зародышевой линии VK1_6. В других вариантах осуществления остатки аминокислот в последовательности переменной области легкой цепи зародышевой линии человека могут быть заменены одним или более остатков из другой последовательности переменной области легкой цепи зародышевой линии человека.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на антигенсвязывающую молекулу, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO.:1, SEQ ID No:3, SEQ ID No:5, SEQ ID No:7, SEQ ID No:9, SEQ ID No:11, SEQ ID No:13, SEQ ID No:15, SEQ ID No:17, SEQ ID No:19, SEQ ID No:21, SEQ ID No:23, SEQ ID No:25, SEQ ID No:27, SEQ ID No:29, SEQ ID No:31, SEQ ID No:33, SEQ ID No:35, SEQ ID No:37, SEQ ID No:39 и SEQ ID No:121, и легкую цепь, включающую полипептид, кодируемый одной или более последовательностей гена переменной области зародышевой линии человека. В предпочтительном варианте осуществления последовательность зародышевой линии человека выделена из последовательности зародышевой линии VK1_6.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на антигенсвязывающую молекулу, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:122 и SEQ ID NO:124; (6) последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106 и SEQ ID NO:126; (в) SEQ ID NO:108 и (г) полипептид, включающий переменную область легкой цепи человека, кодируемую одним или более последовательностей гена зародышевой линии человека. В конкретном варианте осуществления последовательность зародышевой линии человека выделена из последовательности зародышевой линии VK1_6. В другом варианте осуществления последовательность ген переменной области зародышевой линии человека включает последовательность гена зародышевой линии VK1_6 с заменой одной или более кодонов аминокислот последовательностью из последовательности различных генов переменной области легкой цепи зародышевой линии человека.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем изобретении, включает EGFR-специфическую переменную область тяжелой цепи, представленной в настоящем изобретении, и вариант SEQ ID NO:45. В одном варианте осуществления вариант SEQ ID NO:45 включает замену аминокислоты в одном или более положений на участках, определяющих комплементарность (CDR). В специальных вариантах осуществления замена представляет собой остаток аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: положения аминокислоты 30 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 32 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 34 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 50 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 51 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 52 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 53 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 56 SEQ ID NO:45, положения аминокислоты 94 SEQ ID NO:45 и любой комбинации данных замен. В более специальных вариантах осуществления замена в SEQ ID

NO:45 выбрана из группы, состоящей из: замены аргинина (R) на аспарагин (N) в положении 30 SEQ ID NO:45; замены триптофана (W) на тирозин (Y) в положении 32 SEQ ID NO:45; замены глицина (G) на аспарагин (N) в положении 34 SEQ ID NO:45; замены треонина (T) на аспарагин (N) в положении 50 SEQ ID NO:45; замены аланина (A) на треонин (T) в положении 51 SEQ ID NO:45; замены серина (S) на аспарагин (N) в положении 52 SEQ ID NO:45; замены серина (S) на аспарагин (N) в положении 53 SEQ ID NO:45; замены серина (S) на треонин (T) в положении 56 SEQ ID NO:45; замены тирозина (Y) на фенилаланин (F) в положении 94 SEQ ID NO:45 и любых их комбинаций. В конкретном варианте осуществления все из данных замен остатков аминокислот в SEQ ID NO:45 включены в вариант одной легкой цепи. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы, включающие варианты легкой цепи с заменами аминокислот на CDR ICR62, сохраняют специфическое связывание с EGFR (по сравнению с антигенсвязывающей молекулой, включающей вариабельную область легкой цепи, включающей последовательность SEQ ID NO:45), причем вариант легкой цепи спаривают с полипептидом, включающим вариабельную область тяжелой цепи, представленной в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение направлено также на полинуклеотиды, которые кодируют любой из вышеописанных полипептидов и/или антигенсвязывающих молекул. Настоящее изобретение далее направлено на вышеописанные антигенсвязывающие молекулы с фармацевтически приемлемым носителем.

Все публикации, такие как руководства, журнальные статьи, вхождения в GenBank или другие базы данных последовательностей, опубликованные заявки и патентные заявки, упомянутые в данном описании и в данном контексте включенные в виде ссылки в той же самой степени, как если бы для каждой отдельной публикации или патентной заявки были специально и отдельно указано, что она включена в виде ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ГЛИКАРТ БИОТЕХНОЛОГИ АГ, СН

5

<120> Антигенсвязывающие молекулы, которые связывают EGFR, кодирующие их векторы и их применение

<130> 1975.043PC02/TJS/T-M

10

<150> 60/650,115

<151> 2005-02-07

<160> 127

15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 120

20

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> ICR62 VH

25

<400> 1

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

30

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

35

Lys Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

40

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

45

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

50

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

Thr Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

5

115

120

<210> 2

<211> 359

10

<212> ДНК

<213> Rattus sp.

<220>

<223> ICR62 VH

15

<400> 2

cagggtcaacc tactgcagtc tggggctgca ctgggtgaagc ctggggcctc tgtgaagttg 60

tcttgcaaag gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gaagcagagt 120

20

catggaaaga gccttgagtg gattgggtat tttaatccta acagtgggtta tagtacctac 180

aatgaaaagt tcaagagcaa ggccacattg actgcagaca aatccaccga tacagcctat 240

25

atggagctta ccagttctgac atctgaggac tctgcaacct attactgtac aagactatcc 300

ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctc 359

<210> 3

<211> 120

30

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

35

<223> I-HHA

<400> 3

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

40

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

45

20

25

30

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

35

40

45

50

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

	50	55	60
5	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 65	70	75 80
10	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85	90	95
15	Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln 100	105	110
20	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115	120	
25	<210> 4 <211> 360 <212> ДНК <213> Искусственная		
30	<220> <223> I-HHA <400> 4 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc		60
35	tctctgcaagg cttctggatt tacattcact gactacgcc aacagctgggt gcgacaggcc cctggacaag ggctcgagt gatgggaggg atcaatccta acagtgggta tagtacctac gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca		120 180 240 300 360
40	<210> 5 <211> 120 <212> PRT <213> Искусственная		
45	<220> <223> I-HHB <400> 5		
50	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		

	1	5	10	15
5	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr	20	25	30
10	Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35	40	45
15	Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60
20	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
25	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
30	Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln	100	105	110
35	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115	120	
40	<210> 6			
	<211> 360			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная			
45	<220>			
	<223> I-HNB			
50	<400> 6			
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc			60
	tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc			120
	cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac			180
	gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac			240
	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc			300
	ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca			360

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> I-HHC

<400> 7

10

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

15

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

20

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

25

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

30

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

35

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

40

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

45

<220>
 <223> I-HHC

50

<400> 8

5 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
 aatgaaaagt tcaagagcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 10 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

15 <210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная

20 <220>
 <223> I-HLA

<400> 9

25 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 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

35 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

50 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

5 <210> 10
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

10 <220>
 <223> I-HLA

<400> 10
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc ggtgaaggtc 60
 15 tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtggtta tagtacctac 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
 20 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

25 <210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная

30 <220>
 <223> I-HLB

<400> 11

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

40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

45 Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

50 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

5

85

90

95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100

105

110

10

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

15

<210> 12

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная

20

<220>

<223> I-HLB

<400> 12

25

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggetcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180

30

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

35

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

40

<213> Искусственная

<220>

<223> I-HLC

45

<400> 13

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

1

5

10

15

50

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

5

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

10

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

15

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

20

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

25

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

30

<210> 14
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> I-HLC

35

<400> 14
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtc 60

tectgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

40

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcgggta cagtacttac 180

aacgagaagt tcaagagccg ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240

45

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

50

<210> 15
<211> 120
<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> I-HHD

<400> 15

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 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> I-HHD

<400> 16

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcgggaca aatccacgag cacagcctac 240
5 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

10 <210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

15 <220>
<223> I-HHE

<400> 17

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

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

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

30 Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

45 Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

50 <210> 18

<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

5 <220>
<223> I-HHE

<400> 18
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
10 tcctgcaagg gttctgggtt cacattcact gactacaaga taccctgggt gcgacaggct 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
15 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

20

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
25 <213> Искусственная

<220>
<223> I-HHF

30 <400> 19

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

35 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

45 Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn 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

50 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

5

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 20
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

15

<220>
<223> I-HHF

<400> 20
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta ttcgaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

30

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

35

<220>
<223> I-HHG

40

<400> 21

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

45

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

50

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

5

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

10

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

15

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

20

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

25

<210> 22
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

30

<220>
<223> I-HHG

35

<400> 22
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tgccacgtac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

45

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

50

<220>
<223> I-HLA1

<400> 23

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 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> I-HLA1

<400> 24

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180

agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

5

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

10

<220>
<223> I-HLA2

<400> 25

15

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

20

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

25

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

30

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

35

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

40

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

45

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

50

<210> 26
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> I-HLA2

<400> 26

5 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 10 aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 15 ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

20 <213> Искусственная

<220>

<223> I-HLA3

25

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 30 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 35 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 40 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 45 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

	100	105	110
5	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 28		
	<211> 360		
10	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> I-HLA3		
15	<400> 28		
	caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc	60	
	tcctgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc	120	
20	cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac	180	
	agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240	
25	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc	300	
	ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca	360	
30	<210> 29		
	<211> 120		
	<212> PRT		
	<213> Искусственная		
35	<220>		
	<223> I-HLA4		
	<400> 29		
40	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 Asp Tyr		
45	20 25 30		
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35 40 45		
50	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe		

50

55

60

5

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

10

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

15

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

20

<210> 30
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

25

<220>
<223> I-HLA4

<400> 30
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
tctctgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

40

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

45

<220>
<223> I-HLA5

<400> 31

50

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr

	1	5	10	15
5	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr	20	25	30
10	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35	40	45
15	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe	50	55	60
20	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
25	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95
30	Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln	100	105	110
35	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115	120	
40	<210> 32			
	<211> 360			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная			
45	<220>			
	<223> I-HLA5			
50	<400> 32			
	cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc			60
	tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc			120
	cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac			180
	agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac			240
	ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc			300
	ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca			360

<210> 33
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> I-HLA6

<400> 33

10

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

15

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

20

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

25

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

30

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

40

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45

<210> 34
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> I-HLA6

50

<400> 34

cagatgcagc tgggtgcagtc tggggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 5 cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 10 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 35
 15 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 20 <223> I-HLA7

<400> 35

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

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

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

50 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

5

<210> 36
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

10

<220>
<223> I-HLA7

15

<400> 36
cagatgcagc tggatgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggctc 60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cgcggaacaac ggctcgagtg gatcggtctg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

25

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

30

<220>
<223> I-HLA8

<400> 37

35

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

40

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

45

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

50

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

10 Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 38
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

20 <220>
<223> I-HLA8

25 <400> 38
cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
30 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

40 <210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> I-HLA9

45 <400> 39

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

50 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

5

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

10

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

15

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

20

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

25

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

30

<210> 40
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> I-HLA9

35

<400> 40
gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc 60

tcttgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

40

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

45

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

50

<210> 41
<211> 19
<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Сигнальная последовательность

5

<400> 41

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

10

Ala His Ser

15

<210> 42

<211> 57

<212> ДНК

<213> Искусственная

20

<220>

<223> Сигнальная последовательность

<400> 42

25

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

30

<220>

<223> ICR62 VL

35

<400> 43

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

40

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

45

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

50

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

RU 2488597 C2

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

5 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

10 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
100 105

15 <210> 44
<211> 324
<212> ДНК
<213> Rattus sp.

<220>
<223> ICR62 VL

20 <400> 44
gacatccaga tgacccagtc tccttcattc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
atcaactgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actggatatca gcaaaagctt 120
25 ggagaagctc ccaaacgcct gatataataat acaaacaatt tgcaaacagg catcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat tacacactca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacatatatt ctgcttgtag cataatagtt ttcccacggt tggagctggg 300
30 accaagctgg aactgaaacg tacg 324

35 <210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная

40 <220>
<223> I-KC

<400> 45

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

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

50

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

5 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

15 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

20 <210> 46
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная

25 <220>
<223> I-KC

30 <400> 46
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180
35 aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgag cataatagtt ttcccacggt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacg 324

40 <210> 47
<211> 22
<212> PRT
45 <213> Искусственная

<220>
<223> Сигнальная последовательность

50 <400> 47

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

5 Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

10 <210> 48
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная

15 <220>
<223> Сигнальная последовательность

<400> 48
atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
20 aggtgt 66

25 <210> 49
<211> 109
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> I-KA

30 <400> 49

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

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

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

45 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

50 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

5 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105

<210> 50

10 <211> 327

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

15 <223> I-КА

<400> 50

gatatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

20 atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgccct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

25 gaagattttg ccacctatta ctgcttgag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300

accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

30 <210> 51

<211> 109

<212> PRT

<213> Искусственная

35 <220>

<223> I-KB

<400> 51

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

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
50

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

15 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105

<210> 52

<211> 327

<212> ДНК

20 <213> Искусственная

<220>

<223> I-KB

<400> 52

25 gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actggtacca gcagaagcca 120

30 gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300

35 accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

<210> 53

<211> 5

40 <212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи Kabat

45

<400> 53

Asp Tyr Lys Ile His

1 5

50

<210> 54
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Kabat

<400> 54
 gactacaaga tacac

10

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

15

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Kabat

20

<400> 55
 Asp Tyr Ala Ile Ser
 1 5

25

<210> 56
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

30

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Kabat

<400> 56
 gactacgcca tcagc

35

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

40

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Kabat

45

<400> 57
 Asp Tyr Tyr Met His
 1 5

50

5
 <210> 58
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Kabat
 <400> 58
 10 gactactata tgcac 15
 <210> 59
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Chothia
 20 <400> 59
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5
 25
 <210> 60
 <211> 21
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Chothia
 <400> 60
 35 gggttttacat tcactgacta c 21
 <210> 61
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Chothia
 45 <400> 61
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5
 50

<210> 62
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 5
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Chothia
 <400> 62
 10 ggttacacat tcactgаста с 21
 <210> 63
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Chothia
 20 <400> 63
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 1 5
 25
 <210> 64
 <211> 21
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи Chothia
 <400> 64
 35 ggttattcat tcactgаста с 21
 <210> 65
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM
 45 <400> 65
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
 1 5 10
 50

<210> 66
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 5
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM
 <400> 66
 10 gggttttacat tcactgacta caagatacac 30
 <210> 67
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM
 20 <400> 67
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10
 25
 <210> 68
 <211> 30
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM
 <400> 68
 35 gggttttacat tcactgacta cggcatcagc 30
 <210> 69
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM
 45 <400> 69
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10
 50

<210> 70
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

<400> 70
 10 ggttttacat tcactgacta cstatatgcac 30

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

15

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

20

<400> 71
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10

25

<210> 72
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

30

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

<400> 72
 35 ggttacacat tcactgacta cstatatgcac 30

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

40

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

45

<400> 73
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
 1 5 10

50

<210> 74
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

<400> 74
 gggtattcat tcaactgacta caagatacac 30

10

<210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

15

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

20

<400> 75
 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

25

Ser

30

<210> 76
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

35

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 76
 tatttttaatc стаасagtgg ttatagtacc tacaatgaaa agttcaagag c 51

40

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

45

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

50

<400> 77

Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

5 Gly

10 <210> 78
<211> 51
<212> ДНК
<213> Искусственная

15 <220>
<223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 78
gggatcaatc ctaacagtggt ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

20 <210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная

25 <220>
<223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 79

30 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

35 Gly

40 <210> 80
<211> 51
<212> ДНК
<213> Искусственная

45 <220>
<223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 80
tatttcaacc ctaacagcgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

50 <210> 81

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

5 <220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 81

10 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

15

<210> 82
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

20

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

25

<400> 82
 tggatcaatc cтаacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agtttcaggg c 51

30

<210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

35

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 83

40

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

45

<210> 84
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

50

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

 <400> 84
 5 tggatcaatc cтаacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg с 51

 <210> 85
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat
 15
 <400> 85

 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 20 Gly

 25 <210> 86
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 30
 <220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

 <400> 86
 35 tggatcaatc cтаacagtgg ttatagtacc tacaacgaga agttccaagg с 51

 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Искусственная

 <220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat
 45
 <400> 87

 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 50 Gly

<210> 88
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 88
 tattttcaacc cтаacagcgg ttattcgaac tacgcacaga agttccaggg с 51

10

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

15

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

20

<400> 89
 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

25

Gly

30

<210> 90
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

35

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 90
 tattttcaacc cтаacagcgg ttatgccacg tacgcacaga agttccaggg с 51

40

<210> 91
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

45

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Chothia

50

<400> 91

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr

1 5

5

<210> 92

<211> 24

<212> ДНК

10

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи Chothia

15

<400> 92

aatcctaaca gtggttatag tacc

24

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

20

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи Chothia

25

<400> 93

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn

1 5

30

<210> 94

<211> 24

<212> ДНК

35

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи Chothia

40

<400> 94

aaccctaaca gcggttattc gaac

24

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

45

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи Chothia

50

<400> 95

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
 1 5

5

<210> 96

<211> 24

<212> ДНК

10

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи Chothia

15

<400> 96

aaccctaaca gcggttatgc cacg

24

<210> 97

<211> 10

20

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

25

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

<400> 97

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 1 5 10

30

<210> 98

<211> 30

35

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

40

<400> 98

tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc

30

<210> 99

45

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

50

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

<400> 99

Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 1 5 10

5

<210> 100

<211> 30

<212> ДНК

10

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

15

<400> 100

gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc

30

<210> 101

<211> 10

20

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

25

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

<400> 101

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 1 5 10

30

<210> 102

<211> 30

35

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

40

<400> 102

tgggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc

30

<210> 103

45

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

50

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

<400> 103

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn
 1 5 10

5

<210> 104

<211> 30

<212> ДНК

10

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

15

<400> 104

tatttcaacc стаасаgсgg ttattcgaac

30

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

20

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

25

<400> 105

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
 1 5 10

30

<210> 106

<211> 30

<212> ДНК

35

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи AbM

40

<400> 106

tatttcaacc стаасаgсgg ttatgccacg

30

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

45

<213> Искусственная

<220>

50

<223> CDR3 тяжелой цепи Kabat Chothia AbM

<400> 107

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

5

<210> 108

<211> 33

<212> ДНК

10

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи Kabat Chothia AbM

15

<400> 108

ctatccccag gcggttacta tggttatggat gcc

33

<210> 109

<211> 328

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25

<223> константная область IgG1

<400> 109

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
1 5 10 15

30

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

35

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45

40

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
50 55 60

45

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala
85 90 95

50

RU 2488597 C2

	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
					100				105					110			
5	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
			115					120					125				
10	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
		130					135					140					
15	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
	145				150						155					160	
20	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				165					170						175		
25	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
			180						185					190			
30	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
		195					200						205				
35	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
	210					215						220					
40	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	
	225				230						235				240		
45	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
			245						250					255			
50	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
		260					265						270				
55	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
		275					280						285				
60	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
	290						295					300					

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
305 310 315 320

5 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

10 <210> 110
<211> 987
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

15 <220>
<223> константная область IgG1

<400> 110
accaaggggcc catcggtctt ccccttggea cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 60
20 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 120
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 180
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 240
25 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaatct 300
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 360
30 gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccttgaggtc 420
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 480
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 540
35 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 600
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 660
40 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgcgcgtg 780
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 840
45 tccgacggt ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 960
50 agcctctccc tgtctccggg taaatga 987

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

5

<220>
<223> CDR1 легкой цепи Kabat

<400> 111

10

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 112
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная

15

<220>
<223> CDR1 легкой цепи Kabat

<400> 112
aaagcaagtc agaattattaa caattactta aac 33

20

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

25

<220>
<223> CDR1 легкой цепи Kabat

<400> 113

30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

35

<210> 114
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная

40

<220>
<223> CDR1 легкой цепи Kabat

<400> 114
cgggcaagtc agggcattaa caattactta aat 33

45

50

5
 <210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> CDR2 легкой цепи Kabat
 <400> 115
 10
 Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
 1 5
 15
 <210> 116
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 20
 <223> CDR2 легкой цепи Kabat
 <400> 116
 aatacaaaaca atttgcaaac a 21
 25
 <210> 117
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 30
 <220>
 <223> CDR3 легкой цепи Kabat
 <400> 117
 35
 Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 1 5
 40
 <210> 118
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 45
 <220>
 <223> CDR2 легкой цепи Kabat
 <400> 118
 aataccaaca acttgcaaac a 21
 50

<210> 119
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

5

<220>
 <223> CDR3 легкой цепи Kabat

<400> 119
 ttgcagcata atagttttcc caccg 24

10

<210> 120
 <211> 361
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

15

<220>
 <223> I-HLA10

20

<400> 120
 gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc 60
 tcctgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacagatg 120
 cctggaaagg gcctcgagtg gatgggctac ttcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
 g 361

25

30

35

<210> 121
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная

40

<220>
 <223> I-HLA10

45

<400> 121
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

50

RU 2488597 C2

	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr	
				20				25						30			
5	Lys	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35				40						45				
10	Gly	Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
15	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70				75					80		
20	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90				95			
25	Ala	Arg	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
30	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120										
	<210>	122															
	<211>	15															
	<212>	ДНК															
	<213>	Искусственная															
35	<220>																
	<223>	CDR1 тяжелой цепи Kabat															
	<400>	122															
		gactacaaga tatcc															15
40	<210>	123															
	<211>	5															
	<212>	PRT															
	<213>	Искусственная															
45	<220>																
	<223>	CDR1 тяжелой цепи Kabat															
50	<400>	123															

Asp Tyr Lys Ile Ser

1 5

5 <210> 124
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

10 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

<400> 124
 gggtttcacat tcactgacta caagatatcc 30

15

<210> 125
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

20 <220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи AbM

25 <400> 125

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile Ser
 1 5 10

30 <210> 126
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

35 <220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

<400> 126
 tactttcaatc ctaacagtgg ttatagtagacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

40

<210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

45 <220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи Kabat

50 <400> 127

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

5

Формула изобретения

1. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, которая специфично связывает человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR, причем указанное антитело
 10 включает указанную вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и вариабельную область гуманизированной легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает

(а) участок 1, определяющий комплементарность, тяжелой цепи (CDR1),
 15 выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:125; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и
 20 где вариабельная область указанной легкой цепи включает

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:111 или SEQ ID NO:113, и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115 и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117

25 или их комбинацию.

2. Выделенный полинуклеотид по п.1, где указанный выделенный полинуклеотид включает

(а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66,
 30 SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:122 и SEQ ID NO:124; и

(б) последовательность SEQ ID NO:80 и

(в) последовательность SEQ ID NO:108.

3. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, которая специфично связывает человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR, причем указанное антитело
 40 включает вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и вариабельную область гуманизированной легкой цепи, где указанный выделенный полинуклеотид включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:40
 45 и SEQ ID NO:120, и где указанная вариабельная область легкой цепи включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:51.

4. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, которая специфично связывает человеческий EGFR,
 50 как часть гуманизированного антитела к EGFR, причем указанное антитело включает вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и вариабельную область гуманизированной легкой цепи, где указанная вариабельная область

гуманизированной легкой цепи включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39 и SEQ ID NO:121, и где указанная переменная область легкой цепи включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:51.

5. Выделенный полинуклеотид по п.1, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(с) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107.

6. Выделенный полинуклеотид по п.5, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:53; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(с) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107.

7. Выделенный полинуклеотид по п.5, где указанный выделенный полинуклеотид включает

(а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60 и SEQ ID NO:66; и

(б) последовательность SEQ ID NO:80; и

(с) последовательность SEQ ID NO:108.

8. Выделенный полинуклеотид по п.5, где указанный выделенный полинуклеотид включает последовательность

(а) SEQ ID NO:54; и

(б) SEQ ID NO:80; и

(с) SEQ ID NO:108.

9. Выделенный полинуклеотид по п.1, где указанное антитело включает константную область тяжелой цепи или ее фрагмент из видов, отличных от крысы.

10. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область гуманизированной легкой цепи, которая специфично связывает человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR, причем указанное антитело включает переменную область гуманизированной тяжелой цепи и переменную область гуманизированной легкой цепи, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:

125; и

(б) CDR2 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103 и SEQ ID NO:105; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где переменная область указанной легкой цепи включает

(а) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(б) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(в) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

11. Выделенный полинуклеотид по п.10, где указанный выделенный полинуклеотид включает последовательность

(a) SEQ ID NO:114; и

(б) SEQ ID NO:116 или SEQ ID NO:118; и

(в) SEQ ID NO:119.

12. Выделенный полинуклеотид по п.11, где указанный выделенный полинуклеотид включает последовательность

(a) SEQ ID NO:114; и

(б) SEQ ID NO:118; и

(в) SEQ ID NO:119.

13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной легкой цепи, которая специфично связывает человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR, причем указанное антитело включает вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и указанную вариабельную область гуманизированной легкой цепи, где указанный выделенный

полинуклеотид включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:52, и где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39 и SEQ ID NO:121.

14. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной легкой цепи, которая специфично связывает человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR, причем указанное антитело включает вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и указанную вариабельную область гуманизированной легкой цепи, где указанная вариабельная область легкой цепи включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:51, и где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39 и SEQ ID NO:121.

15. Выделенный полинуклеотид по п.10, где указанное антитело включает константную область легкой цепи или ее фрагмент из видов, отличных от крысы.

16. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и вариабельную область гуманизированной легкой цепи, которые специфично связывают человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR, где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:125; и

(б) CDR2 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:75, SEQ

ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103 и SEQ ID NO:105; и

(в) CDR3 тяжелой цепи является SEQ ID NO:107; и

где переменная область указанной легкой цепи включает

(а) CDR1 легкой цепи является SEQ ID NO:113, и

(б) CDR2 легкой цепи является SEQ ID NO:115 и

(в) CDR3 легкой цепи является SEQ ID NO:117.

17. Выделенный полинуклеотид по п.16, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:91 и SEQ ID NO:97; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где указанная переменная область легкой цепи включает

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

18. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:53; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107;

где указанная переменная область легкой цепи включает

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

19. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:59; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:91; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107;

где указанная переменная область легкой цепи включает

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

20. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанная переменная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:97; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где указанная переменная область легкой цепи включает

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

21. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанный полинуклеотид включает

(а) SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60 или SEQ ID NO:66; и

(б) SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:92 или SEQ ID NO:98; и

(в) SEQ ID NO:108; и

(г) SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:116 или SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

22. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанный полинуклеотид включает

(а) SEQ ID NO:54; и

(б) SEQ ID NO:80; и

(в) SEQ ID NO:108; и

(г) SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

23. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанный полипуклеотид включает

(а) SEQ ID NO:60; и

(б) SEQ ID NO:92; и

(в) SEQ ID NO:108; и

(г) SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

24. Выделенный полинуклеотид по п.17, где указанный полинуклеотид включает

(а) SEQ ID NO:66; и

(б) SEQ ID NO:98; и

(в) SEQ ID NO:108; и

(г) SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

25. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи и вариабельную область гуманизированной легкой цепи, которые специфично связывают человеческий EGFR, как часть гуманизированного антитела к EGFR,

где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:125; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где вариабельная область указанной легкой цепи включает

(а) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:111 или SEQ ID NO:113; и

(б) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(в) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

26. Выделенный полинуклеотид по п.25, где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107;

где вариабельная область указанной легкой цепи включает

(a) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:111 или SEQ ID NO:113; и

(б) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(в) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

27. Выделенный полинуклеотид по п.26, где указанный полинуклеотид включает

(a) SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60 или SEQ ID NO:66; и

(б) SEQ ID NO:80; и

(в) SEQ ID NO:108;

(г) SEQ ID NO:112 или SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:116 или SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

28. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-27, где указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:15, и где указанная переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:45.

29. Выделенный полинуклеотид по п.28, где указанный полинуклеотид включает SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:46.

30. Вектор экспрессии, включающий выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-29.

31. Вектор экспрессии, включающий выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-9 и выделенный полинуклеотид по любому из пп.10-15.

32. Вектор экспрессии, включающий выделенный полипуклеотид по любому из пп.16-29.

33. Композиция для экспрессии антитела, которое связывает человеческий EGFR, включающая выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-9 и выделенный полинуклеотид по любому из пп.10-15 в эффективном количестве для экспрессии указанного антитела.

34. Клетка-хозяин для экспрессии антитела, которое связывает человеческий EGFR, включающая выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-29.

35. Клетка-хозяин для экспрессии антитела, которое связывает человеческий EGFR, включающая вектор экспрессии по п.30.

36. Клетка-хозяин для экспрессии антитела, которое связывает человеческий EGFR, включающая композицию по п.33.

37. Клетка-хозяин по п.34, включающая первый выделенный полинуклеотид и второй выделенный полинуклеотид, где указанный первый выделенный полинуклеотид кодирует

(a) CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107,

где указанный выделенный второй полинуклеотид кодирует

(a) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(б) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(в) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

38. Клетка-хозяин по п.34, включающая первый выделенный полинуклеотид и второй выделенный полинуклеотид, где указанный выделенный первый полинуклеотид кодирует

(a) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:53; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107;

где указанный выделенный второй полинуклеотид кодирует

(а) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(б) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(в) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

5 39. Клетка-хозяин по п.34, включающая первый выделенный полинуклеотид и второй выделенный полинуклеотид, где указанный первый выделенный полинуклеотид включает

(а) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60 и SEQ ID NO:66; и

(б) последовательность SEQ ID NO:80; и

(в) последовательность SEQ ID NO:108; и

где указанный второй выделенный полинуклеотид включает последовательность

(а) SEQ ID NO:114; и

15 (б) SEQ ID NO:116 или SEQ ID NO:118; и

(в) SEQ ID NO:119.

40. Клетка-хозяин по п.34, включающая первый выделенный полинуклеотид и второй выделенный полинуклеотид, где указанный первый выделенный полинуклеотид включает последовательность

(а) SEQ ID NO:54; и

(б) SEQ ID NO:80; и

(в) SEQ ID NO:108; и

где указанный второй выделенный полинуклеотид включает последовательность

25 (а) SEQ ID NO:114; и

(б) SEQ ID NO:118; и

(в) SEQ ID NO:119.

41. Клетка-хозяин по п.34, включающая первый выделенный полинуклеотид и второй выделенный полинуклеотид,

где указанный первый выделенный полинуклеотид включает последовательность SEQ ID NO:16; и

где указанный второй выделенный полинуклеотид включает последовательность SEQ ID NO:46.

35 42. Клетка-хозяин по п.34, включающая первый выделенный полинуклеотид и второй выделенный полинуклеотид,

где указанный первый выделенный полинуклеотид кодирует полипептид SEQ ID NO:15; и

40 где указанный второй выделенный полинуклеотид кодирует полипептид SEQ ID NO:45.

43. Способ получения антитела, которое способно конкурировать с крысиным антителом ICR62 за связывание с человеческим EGFR, и причем указанное антитело является химерным, который заключается в

45 (а) культивировании клетки-хозяина по п.34 в среде в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного полинуклеотида, и

(б) выделение указанного антитела.

44. Выделенный полипептид для связывания человеческого EGFR, как часть анти-EGFR антитела, кодируемый полинуклеотидом по пп.1-29.

50 45. Антитело, которое связывает EGFR, включающее первый выделенный полипептид, кодируемый полинуклеотидом по любому из пп.1-9, и второй выделенный полипептид, кодируемый полинуклеотидом по любому из пп.10-15.

46. Антитело по п.45, где указанное антитело включает первый полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO:15, и второй полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO:45.

47. Антитело по п.45, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид,

где указанный первый полипептид включает последовательность:

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107,

где указанный второй полипептид включает последовательность

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

48. Антитело по п.47,

где указанный первый полипептид включает последовательность

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:53; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107, и

где указанный второй полипептид включает последовательность

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

49. Антитело, которое специфично связывает EGFR, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид и Fc-участок,

где указанный первый полипептид включает последовательность

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:125; и

(б) CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103 и SEQ ID NO:105; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107,

где указанный второй полипептид включает последовательность

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

50. Антитело по п.49,

где указанный первый полипептид включает последовательность

(а) CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:91 и SEQ ID NO:97; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107, и

где указанный второй полипептид включает последовательность

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

51. Антитело по п.50,

где указанный первый полипептид включает последовательность:

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:53; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где указанный второй полипептид включает последовательность:

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

52. Антитело по п.50,

где указанный первый полипептид включает последовательность:

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:59; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:91; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где указанный второй полипептид включает последовательность:

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

53. Антитело по п.50,

где указанный первый полипептид включает последовательность:

(а) CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO:65; и

(б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:97; и

(в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107; и

где указанный второй полипептид включает последовательность:

(г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:113; и

(д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и

(е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

54. Антитело по любому из пп.50-53, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид,

где указанный первый полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

(а) SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60 или SEQ ID NO:66; и

(б) SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:92 или SEQ ID NO:98; и

(в) SEQ ID NO:108,

где указанный второй полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

(г) SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:116 или SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

55. Антитело по п.54, где указанный первый полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

(а) SEQ ID NO:54; и

(б) SEQ ID NO:80; и

(в) SEQ ID NO:108,

где указанный второй полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

- (a) SEQ ID NO:114; и
- (б) SEQ ID NO:118; и
- (в) SEQ ID NO:119.

56. Антитело по п.54, где указанный первый полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

- (a) SEQ ID NO:60; и
- (б) SEQ ID NO:92; и
- (в) SEQ ID NO:108,

где указанный второй полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

- (a) SEQ ID NO:114; и
- (б) SEQ ID NO:118; и
- (в) SEQ ID NO:119.

57. Антитело по п.54, где указанный первый полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

- (a) SEQ ID NO:66; и
- (б) SEQ ID NO:98; и
- (в) SEQ ID NO:108,

где указанный второй полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

- (a) SEQ ID NO:114; и
- (б) SEQ ID NO:118; и
- (в) SEQ ID NO:119.

58. Антитело, которое специфично связывает EGFR, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид и Fc-участок, где указанный первый полипептид включает последовательность

(a) CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:125; и

- (б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79 и
- (в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107,

где указанный второй полипептид включает последовательность

- (г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:111 или SEQ ID NO:113; и
- (д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и
- (е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

59. Антитело по п.58,

где указанный первый полипептид включает последовательность

(a) CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:65; и

- (б) CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO:79 и
- (в) CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:107,

где указанный второй полипептид включает последовательность

- (г) CDR1 легкой цепи SEQ ID NO:111 или SEQ ID NO:113; и
- (д) CDR2 легкой цепи SEQ ID NO:115; и
- (е) CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:117.

60. Антитело по п.59, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид,

где указанный первым полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность

(a) SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60 или SEQ ID NO:66; и

(б) SEQ ID NO:80; и

(в) SEQ ID NO:108,

где указанный второй полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность:

(г) SEQ ID NO:112 или SEQ ID NO:114; и

(д) SEQ ID NO:116 или SEQ ID NO:118; и

(е) SEQ ID NO:119.

61. Антитело, которое специфично связывает EGFR, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид и Fc-участок, где указанный первый полипептид включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39 и SEQ ID NO:121; и где указанный второй полипептид включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:51.

62. Антитело, которое специфично связывает EGFR, где указанное антитело включает первый полипептид и второй полипептид и Fc-участок, где указанный первый полипептид включает SEQ ID NO:1; и где указанный второй полипептид включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:51.

63. Антитело по любому из пп.49-61, где указанное антитело содержит первый полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO:15, и второй полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO:45.

64. Антитело по п.63, где указанный первый полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность SEQ ID NO:16, и второй полипептид кодируется полинуклеотидом, включающим последовательность SEQ ID NO:46.

65. Антитело по любому из пп.49-64, причем указанный Fc-участок представляет собой человеческий Fc-участок.

66. Антитело по п.65, причем указанное антитело подвергнуто гликоинженерингу с целью получения измененной структуры олигосахаридов на Fc-участке.

67. Антитело по п.66, причем указанный Fc-участок имеет уменьшенное число остатков фукозы по сравнению с негликоинженерным антителом.

68. Антитело по п.67, в котором по меньшей мере 70% олигосахаридов на Fc-участке являются нефукозилированными.

69. Антитело по любому из пп.49-68, где указанное антитело является гуманизированным антителом.

70. Способ детекции in vivo или in vitro присутствия EGFR в образце, заключающийся в:

(а) контактировании тестируемого образца, необязательно с контрольным образом, с антителом по любому из пп.49-69 в условиях, обеспечивающих формирование комплекса между антителом и EGFR и

(б) детекции указанных комплексов антитело-EGFR.

71. Клетка-хозяин для экспрессии полученного в результате гликоинженеринга

антитела, которое специфично связывает человеческий EGFR, где клетка-хозяин экспрессирует антитело по п.65 и по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, имеющий активность $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, в количестве, достаточном для модификации олигосахаридов на Fc-участке антитела.

72. Клетка-хозяин по п.71, в которой указанное антитело, продуцируемое указанной клеткой-хозяином, проявляет повышенную аффинность связывания Fc-рецептора в результате указанной модификации.

73. Клетка-хозяин по п.71, в которой указанное антитело, продуцируемое указанной клеткой-хозяином, проявляет повышенную эффекторную функцию в результате указанной модификации.

74. Клетка-хозяин по п.73, в которой указанная повышенная эффекторная функция представляет собой повышенную Fc-опосредованную клеточную цитотоксичность.

75. Фармацевтическая композиция для связывания человеческого EGFR, включающая эффективное количество антитела по любому из пп.49-69.

76. Применение фармацевтической композиции по п.75 для лечения связанного с EGFR нарушения.

77. Применение фармацевтической композиции по п.75 для лечения или диагностики связанного со сверхэкспрессией EGFR нарушения.

78. Применение фармацевтической композиции по п.75 для лечения пролиферации клеток, которую лечат блокированием EGFR-опосредованной передачи сигнала.

79. Применение антитела по любому из пп.49-69 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики рака, характеризующегося экспрессией EGFR.

80. Применение по п.79, в котором указанное антитело используется в терапевтически эффективном количестве, которое составляет от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

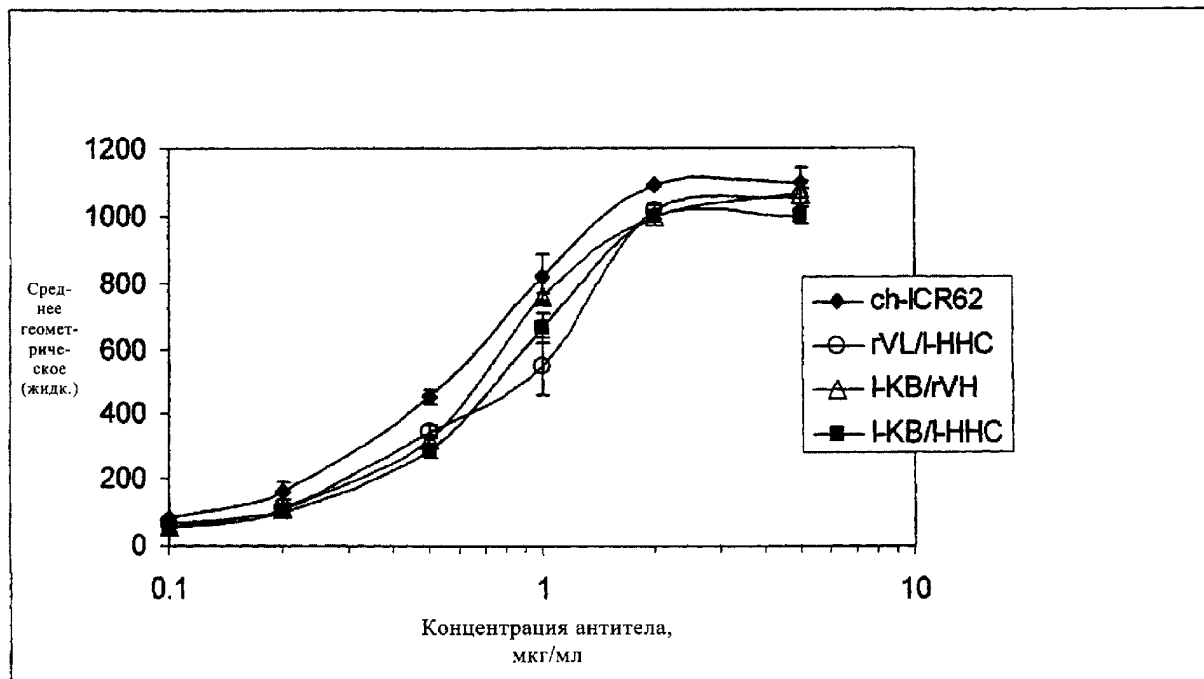
81. Применение антитела по любому из пп.46-69 для лечения связанного с EGFR нарушения, причем указанное лечение дает в результате сывороточные концентрации указанного антитела от приблизительно 1 до приблизительно 100 мкг/мл в течение по меньшей мере 4 недель, и при этом указанное лечение не приводит к клинически значимому уровню токсичности у указанного млекопитающего.

82. Антитело по любому из пп.49-69 для применения в качестве лекарственного средства для лечения связанного с EGFR нарушения.

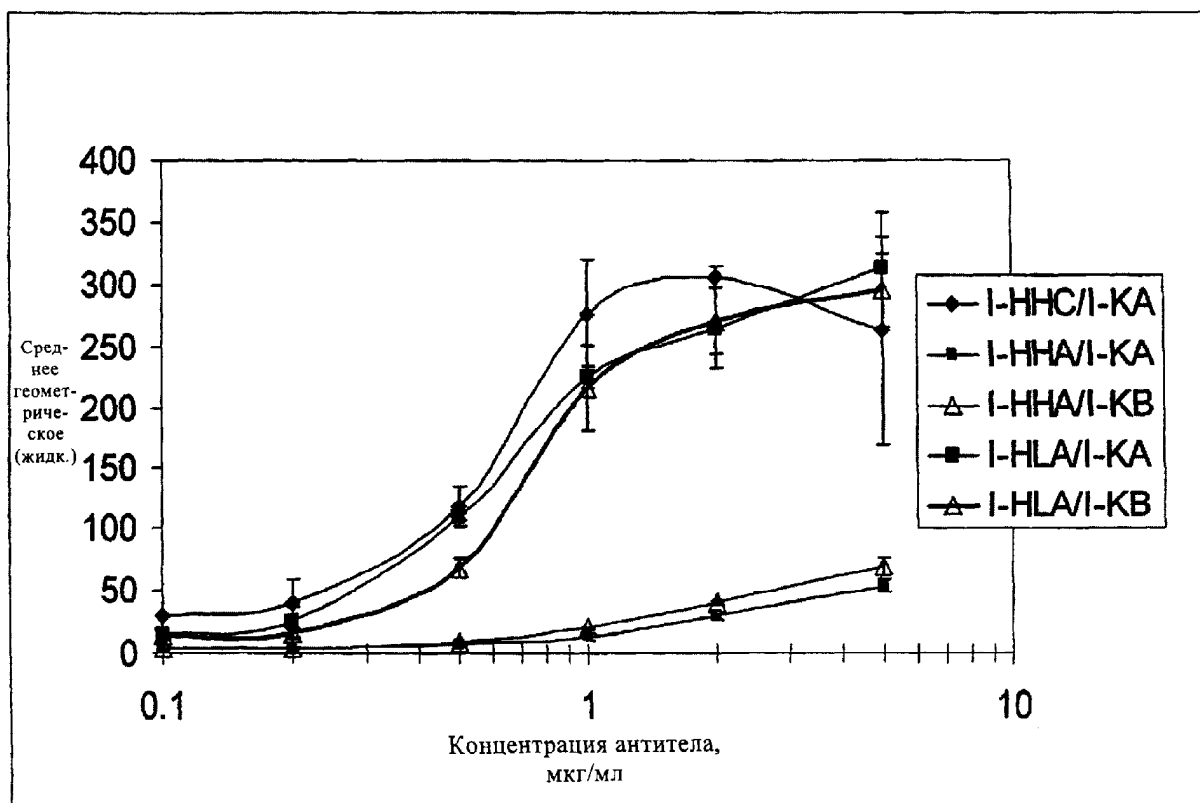
83. Антитело по п.82, где связанное с EGFR нарушение характеризуется сверхэкспрессией EGFR.

84. Антитело по п.82, где связанное с EGFR нарушение представляет собой рак.

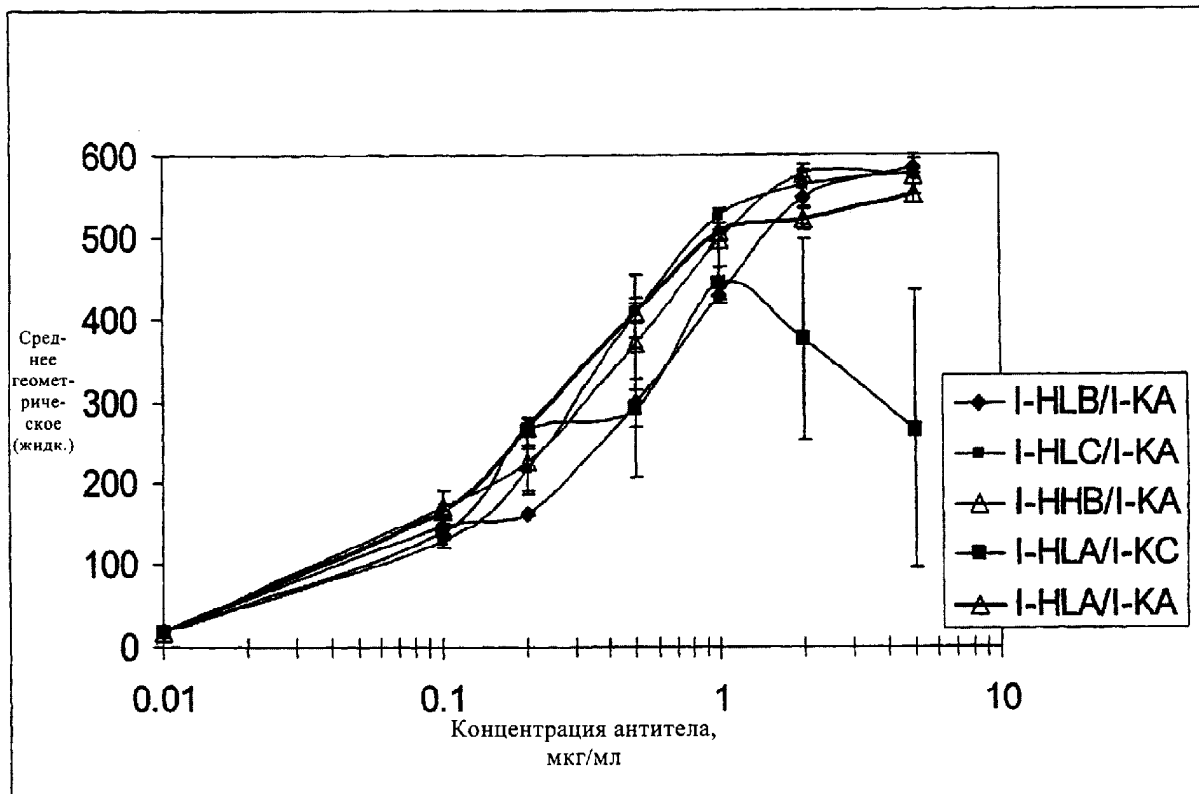
85. Антитело по п.82, в котором рак выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, рака кожи, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака яичников, рака толстой кишки, рака простаты, рака почки и рака головного мозга.



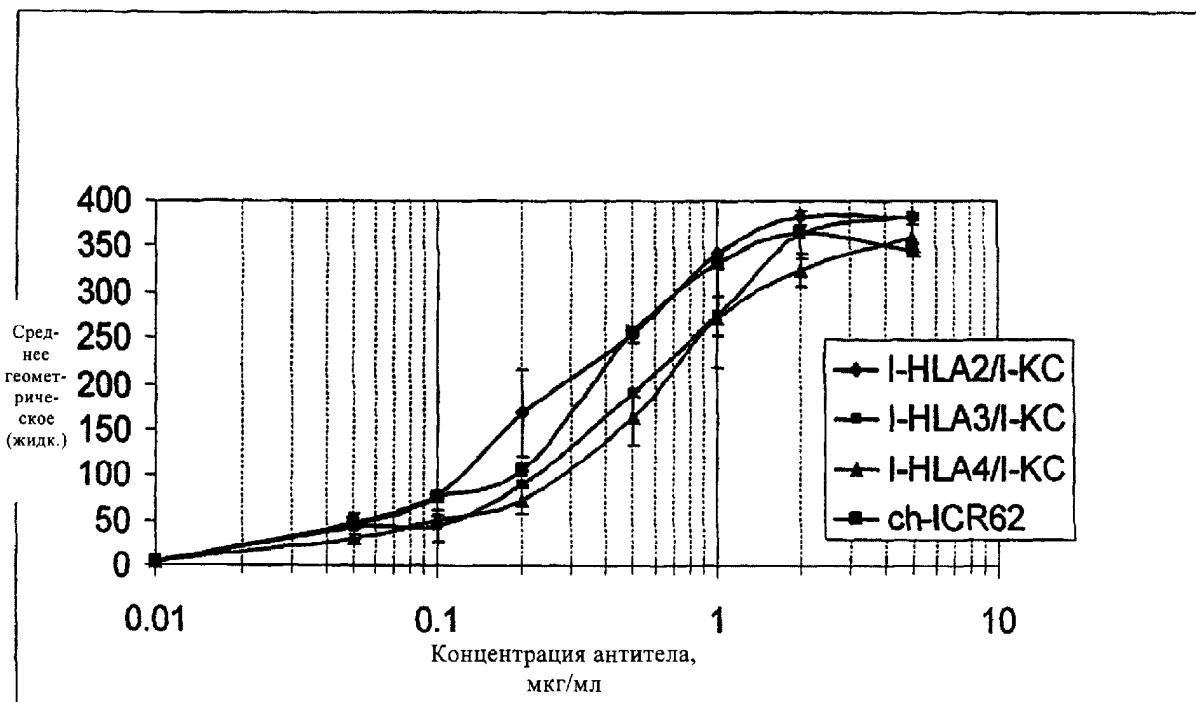
ФИГ. 1



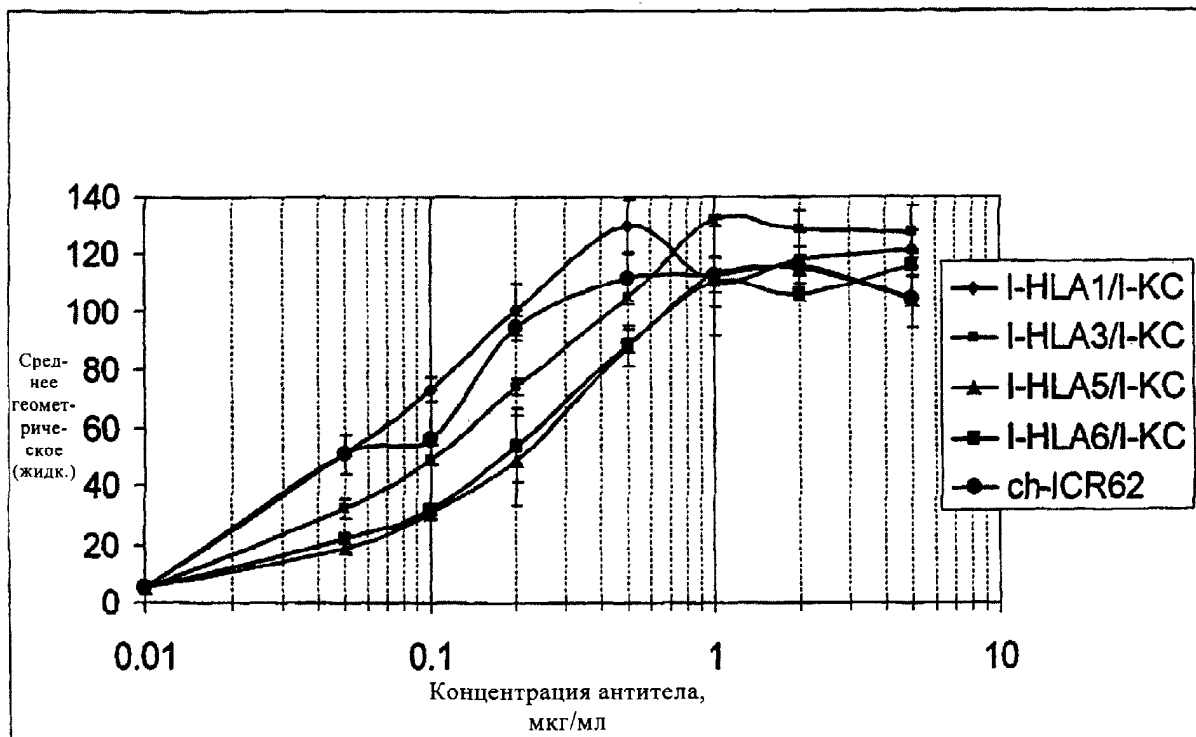
ФИГ. 2



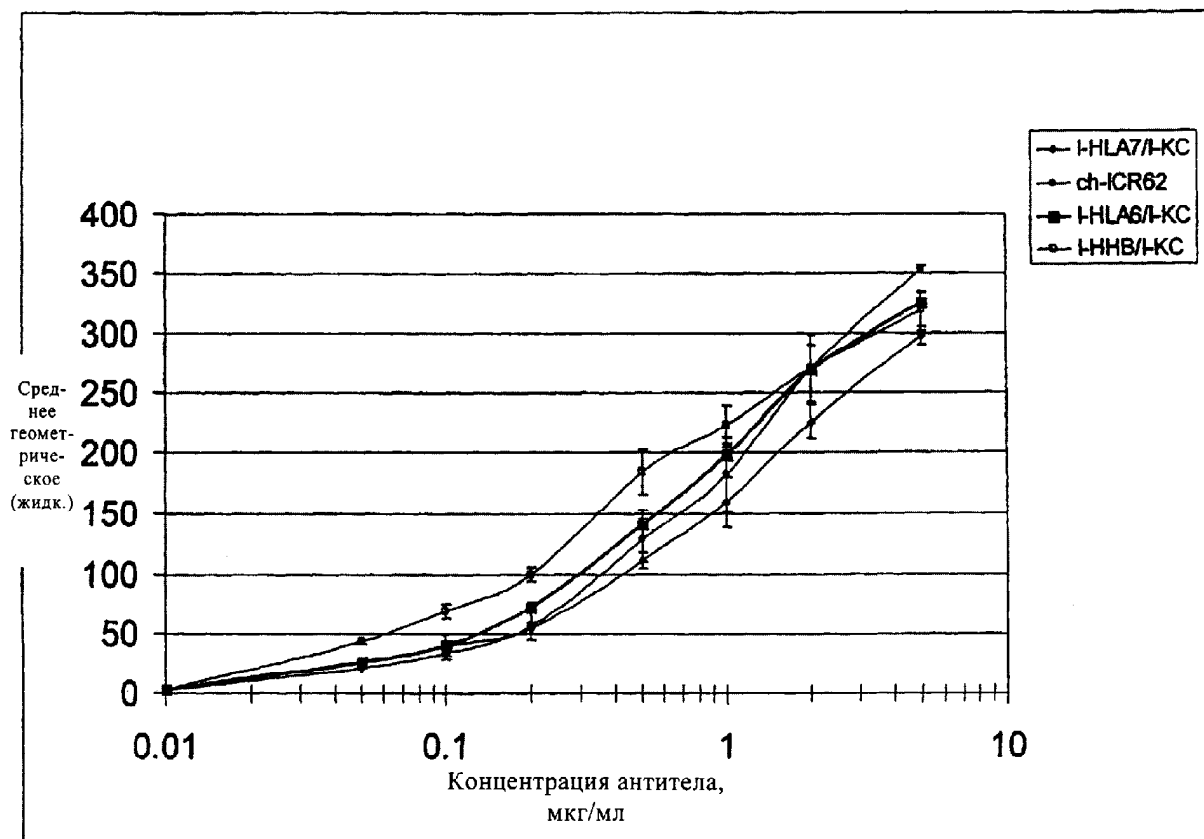
ФИГ. 3



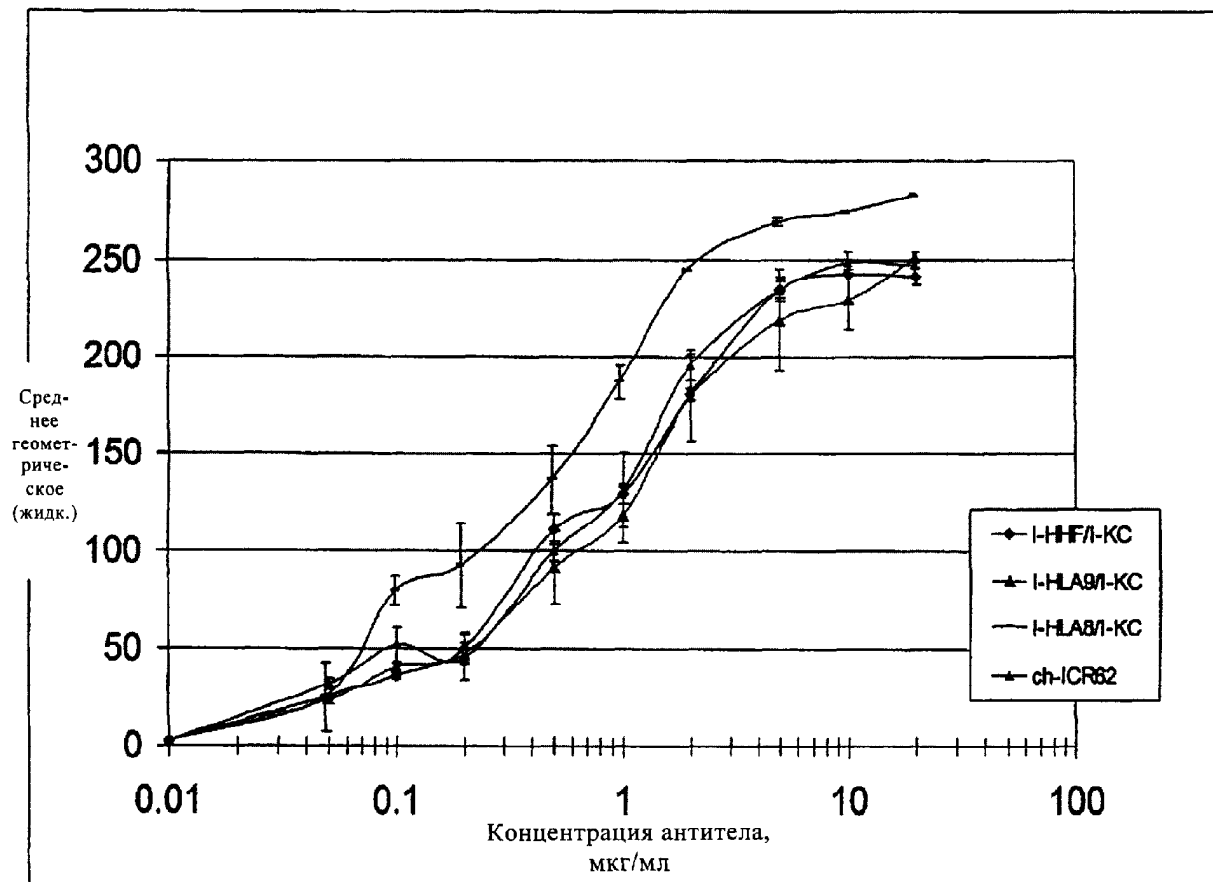
ФИГ. 4



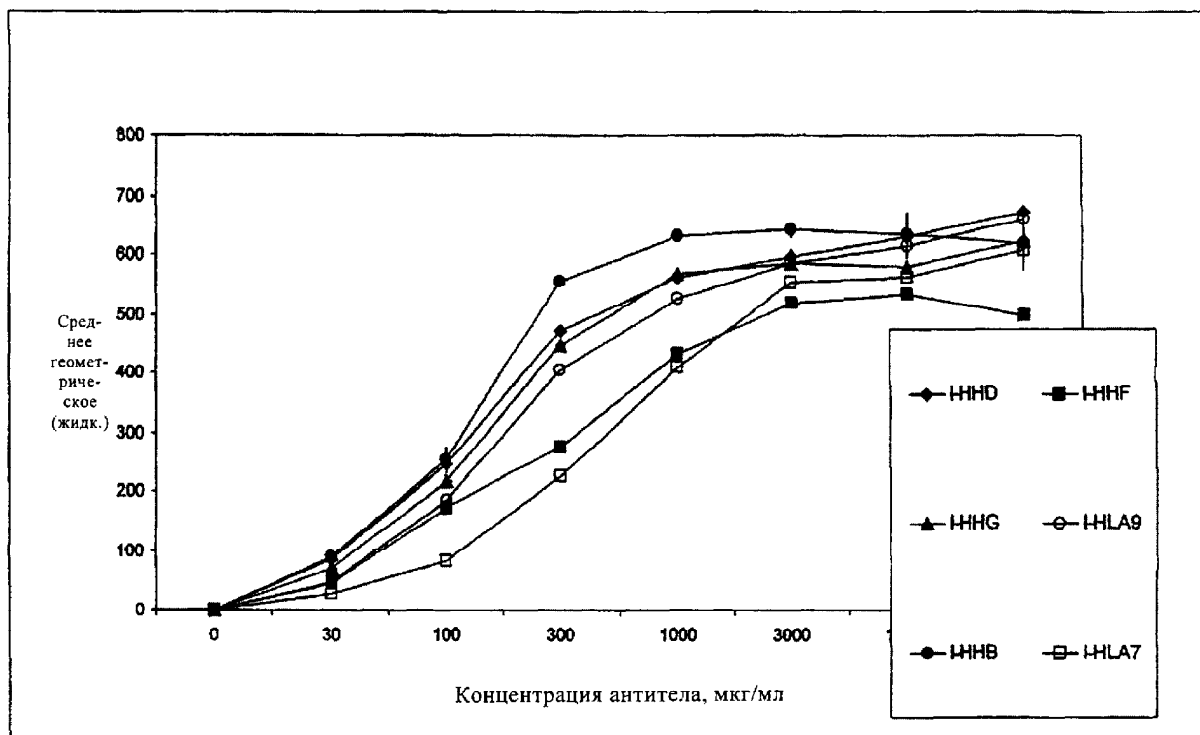
ФИГ. 5



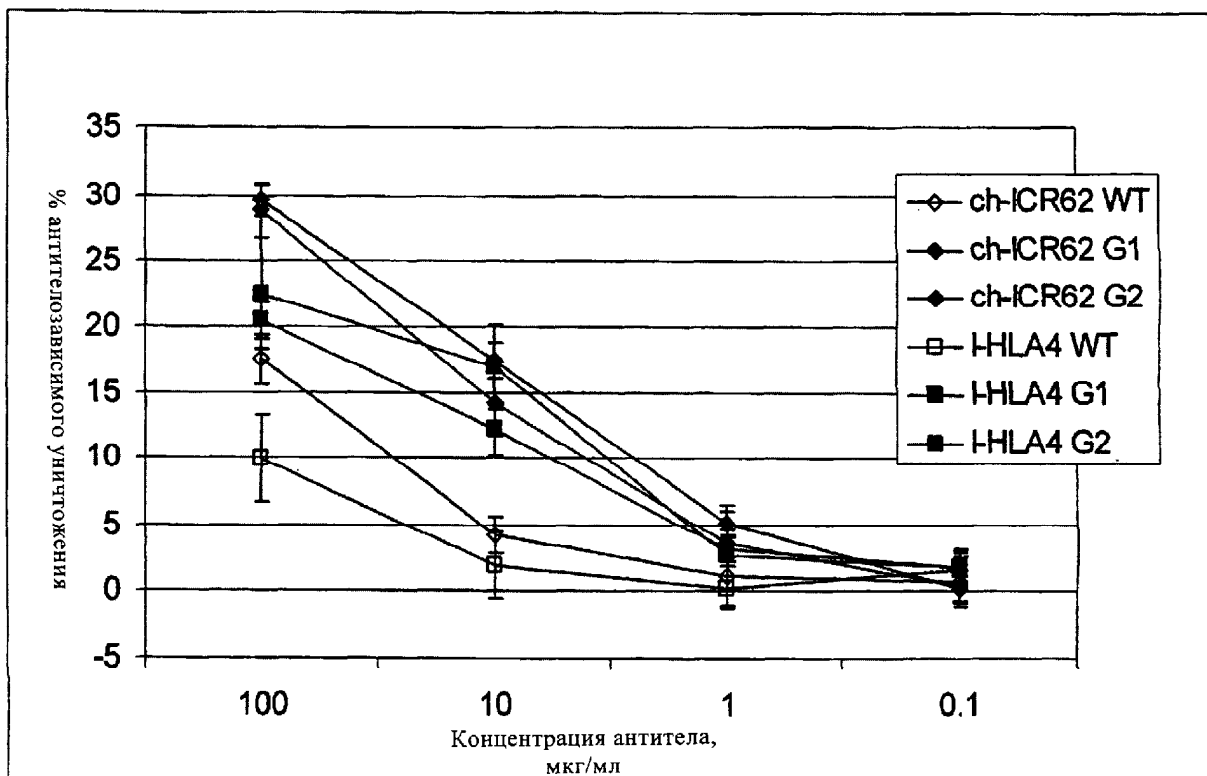
ФИГ. 6



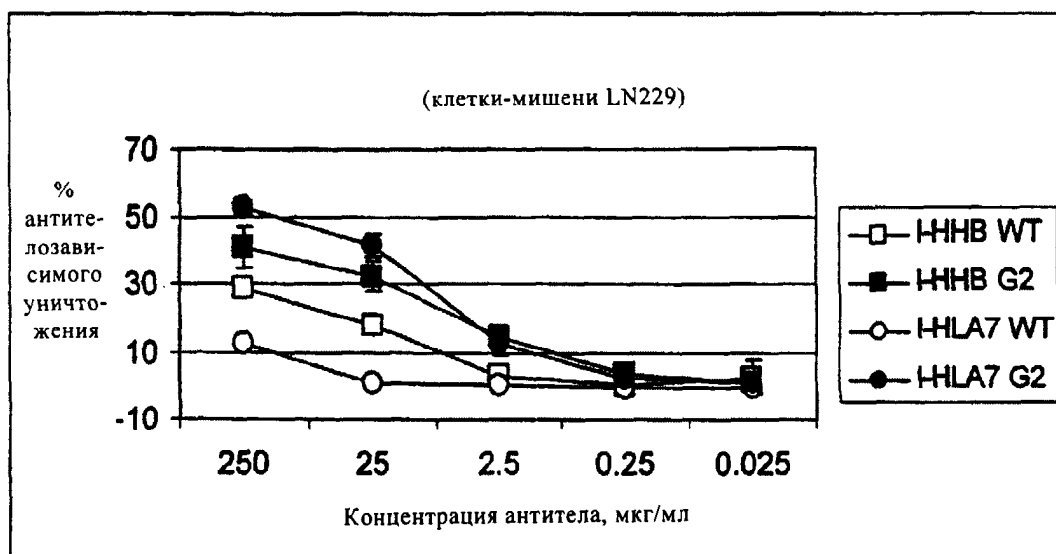
ФИГ. 7



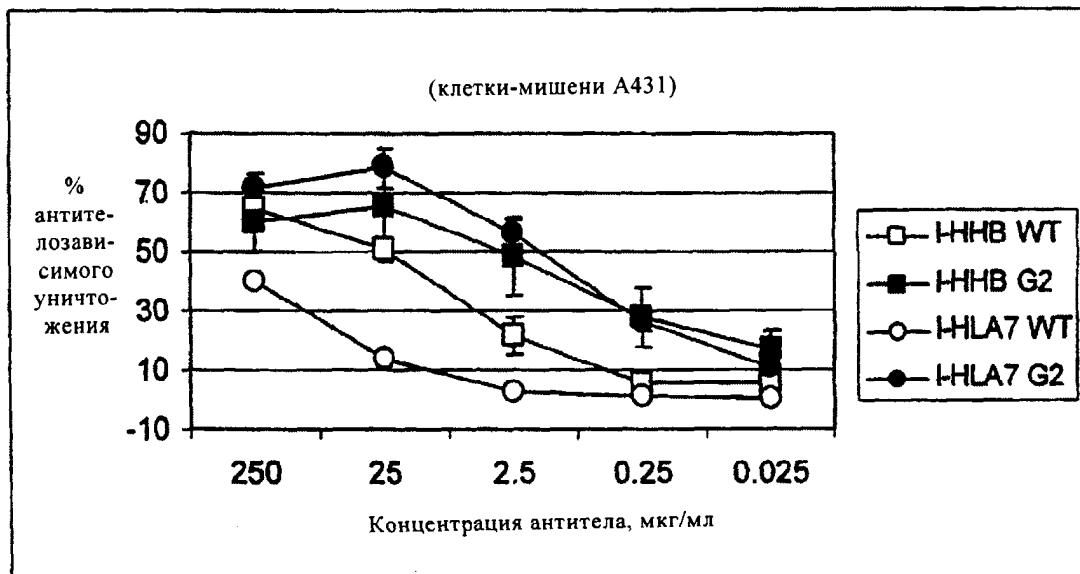
ФИГ. 8



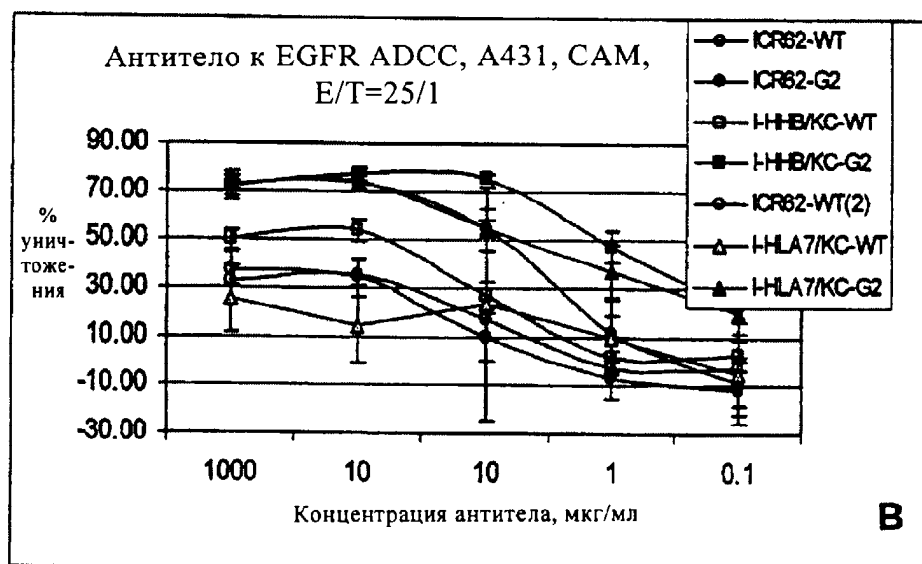
ФИГ. 9



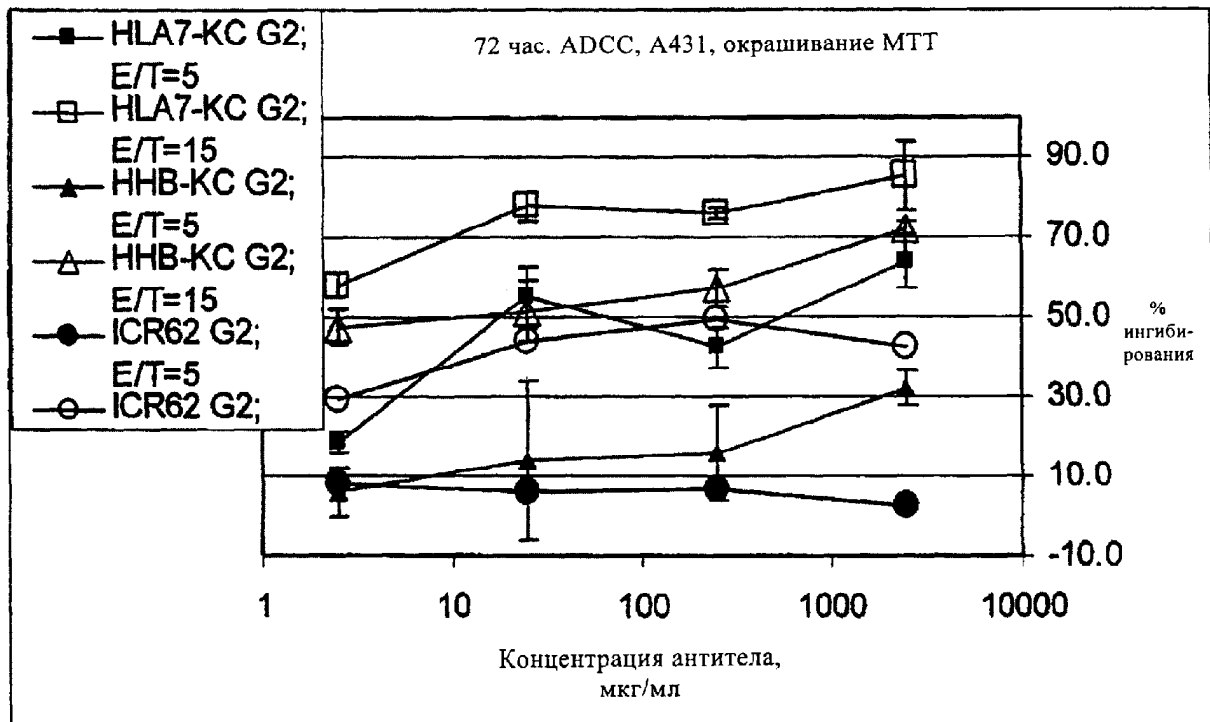
ФИГ. 10А



ФИГ. 10Б



ФИГ. 11

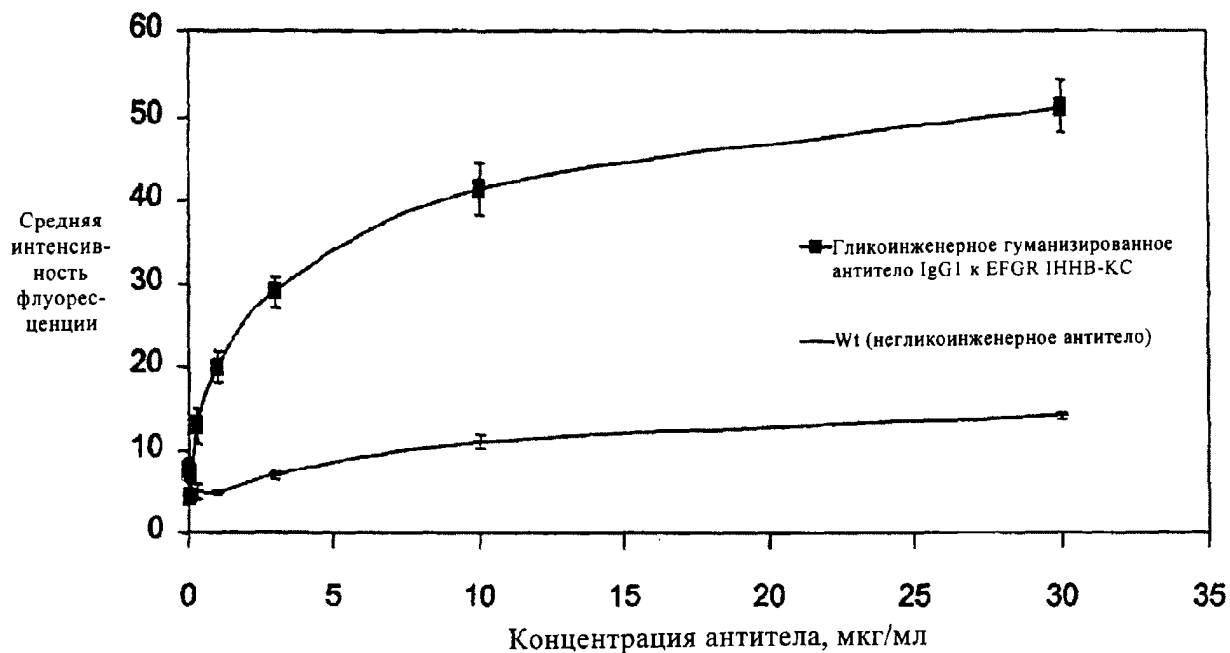


ФИГ. 12

ICR62-VH	1 QVNLQSGAALVKPGASVLSCKGSGFTPTDYKIEWVKQSHGKSLWIGYPNPNHSGYSTYNEKFKSKATLTADKSTDTAYMELTSLTSED
I-HHA.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...A.S.R.AP.QG...M.GI...AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HHB.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...R.AP.QG...M...AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HHC.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...R.AP.QG...M...RV.I...S...S.R...
I-HHD.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...R.AP.QG...M...AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HHE.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...S.R.AP.QG...M...AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HHF.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...R.AP.QG...M...N.AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HHG.pep	1 .Q.V...EVK...S...V...A...R.AP.QG...M...A.AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HLA.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...AQ..QGRV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLB.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...R.AP.QG...M...AQ..QGRV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLC.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...RV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLA1.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA2.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...QGVV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA3.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA4.pep	1 .Q.V...EVK...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...QGVV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA5.pep	1 .MQ.V...PEVK...T...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA6.pep	1 .MQ.V...PEVK...T...V...A...Y.M...R.AP.QG...M.WI...QGVV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA7.pep	1 .MQ.V...PEVK...T...V...A...R.AP.QR...M.WI...QGVV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA8.pep	1 .MQ.V...PEVK...T...V...A...R.AP.QG...M...AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HLA9.pep	1 E.Q.V...EVK...E.L.I...YS...R.AP.QG...M...AQ..QGRV.I...S...S.R...
I-HLA10.pep	1 E.Q.V...EVK...E.L.I...YS...R.MP..G...M...SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
ICR62-VH-wt	91 SATYYCTRLSPGGTYVMDANGQGASVTVSS
I-HHA.pep	91 T.V...A...TT...
I-HHB.pep	91 T.V...A...TT...
I-HHC.pep	91 T.V...A...TT...
I-HHD.pep	91 T.V...A...TT...
I-HHE.pep	91 T.V...A...TT...
I-HHF.pep	91 T.V...A...TT...
I-HHG.pep	91 T.V...A...TT...
I-HLA.pep	91 T.V...A...TT...
I-HLB.pep	91 T.V...A...TT...
I-HLC.pep	91 T.V...A...TT...
I-HLA1.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA2.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA3.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA4.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA5.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA6.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA7.pep	91 T.M...A...TT...
I-HLA8.pep	91 T.V...A...TT...
I-HLA9.pep	91 T.V...A...TT...
I-HLA10.pep	91 T.M...A...TT...

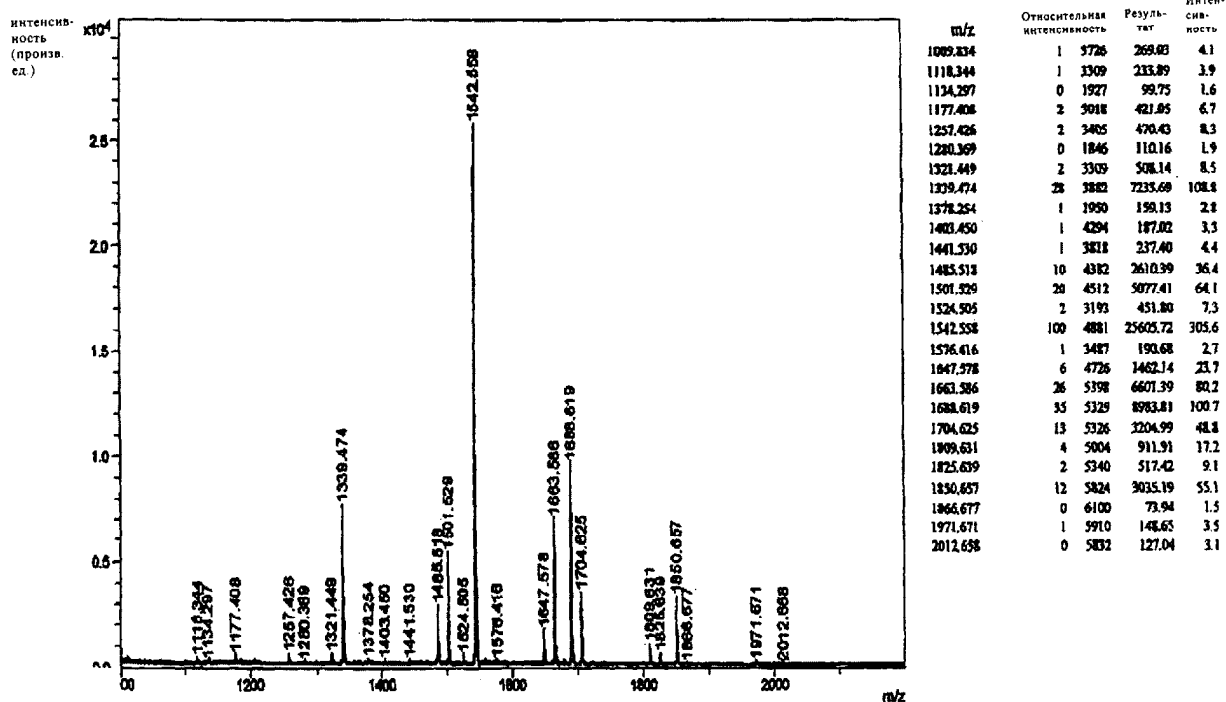
ФИГ. 13

Анализ связывания FcγRIIIa-Fc с использованием клеток CHO,
представляющих рекомбинантный человеческий FcγRIIIa



ФИГ. 14

Профиль олигосахаридов, полученный с помощью
MALDI/TOF-MS для гликоинженерного гуманизированного
антитела IgG1 к EGFR INHB-KC



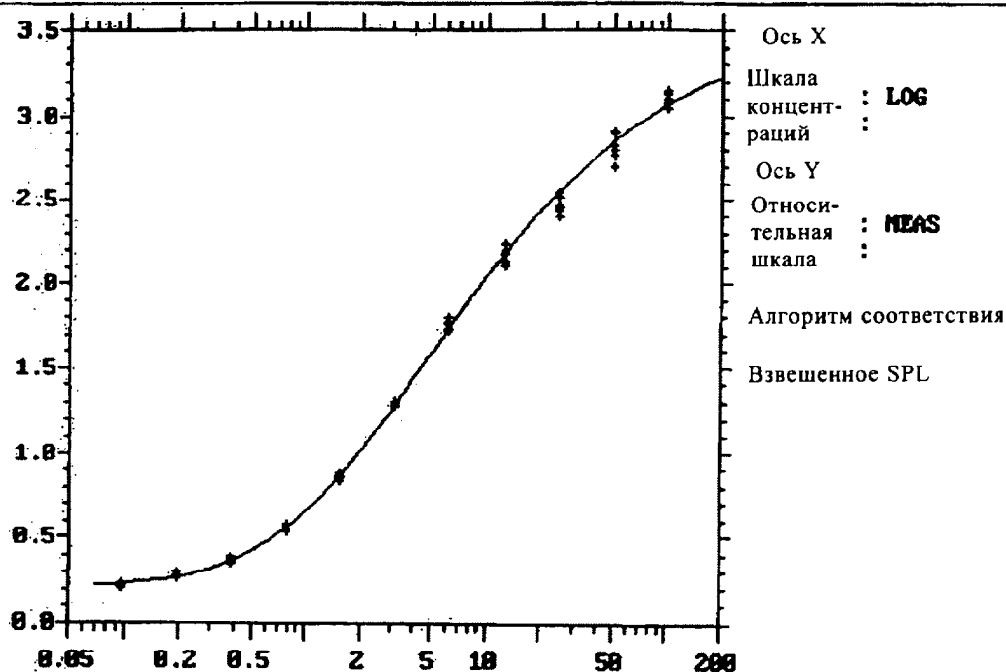
ФИГ. 15

Точный профиль антитела к EGFR

Уровень 5.M: Оценить: Стандартная кривая

134 ORJ882

01 05-MAR-87.01



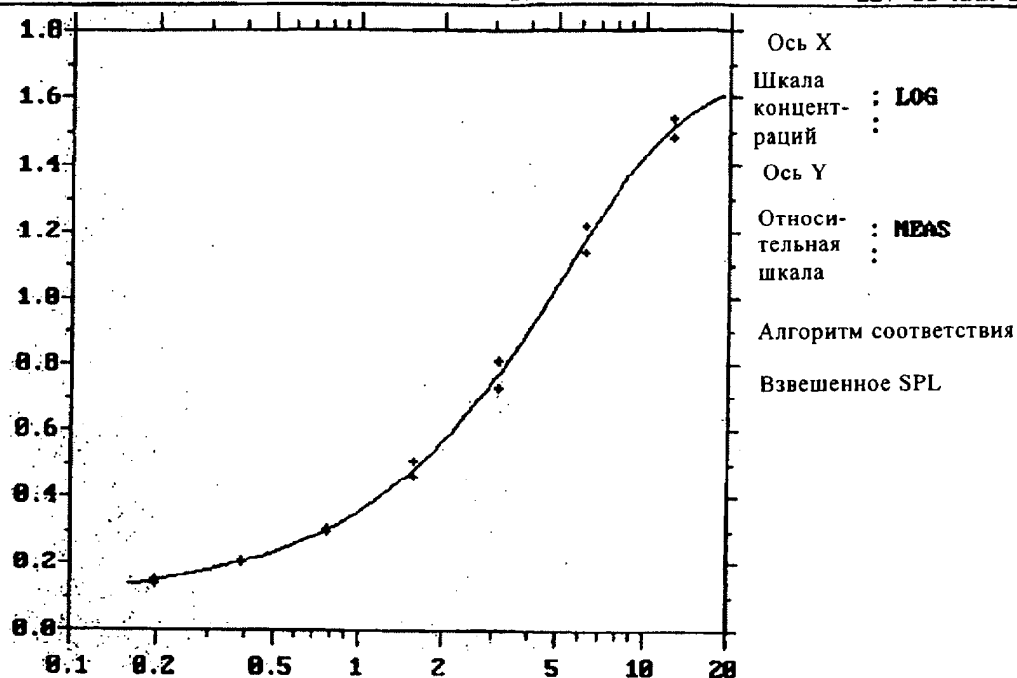
ФИГ. 16

Репрезентативная калибровочная кривая антитела к
EGFR

Уровень 5.M: Оценить: Стандартная кривая

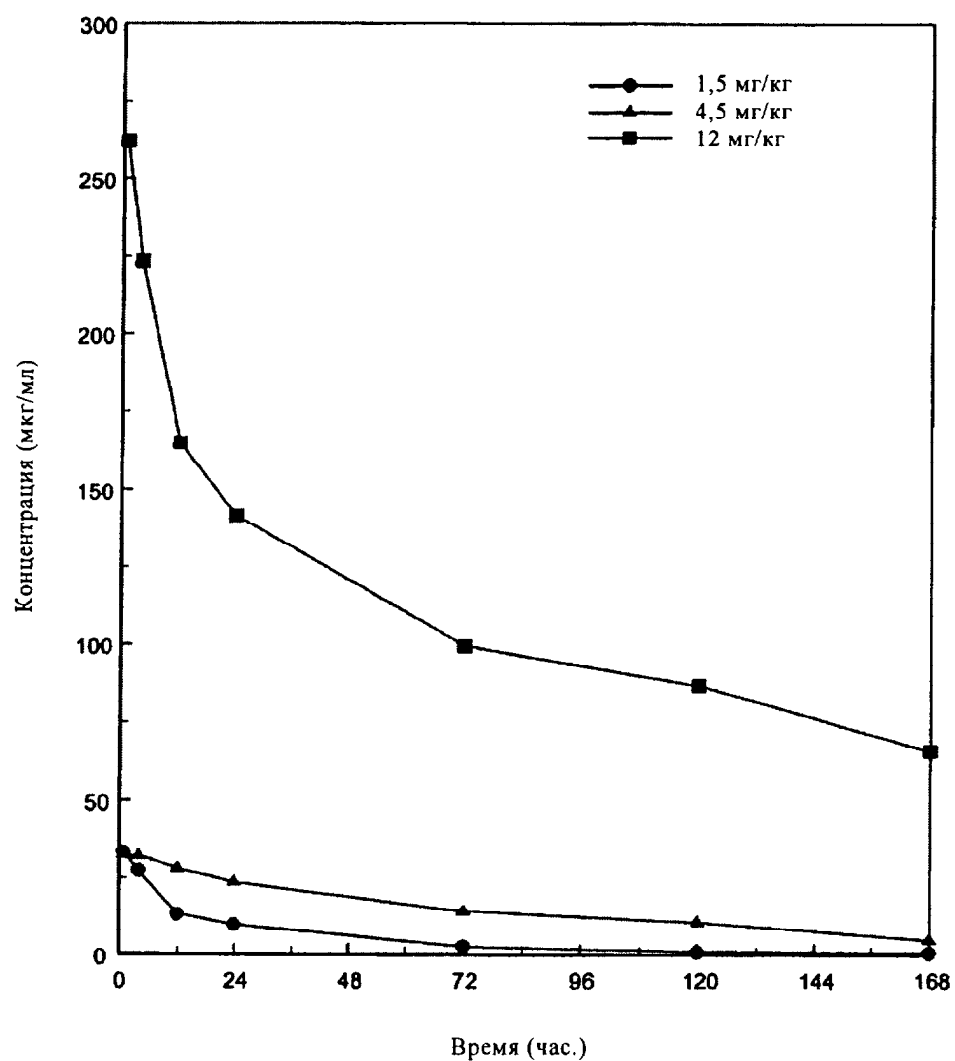
134 ORJ882

12 05-MAR-21.01



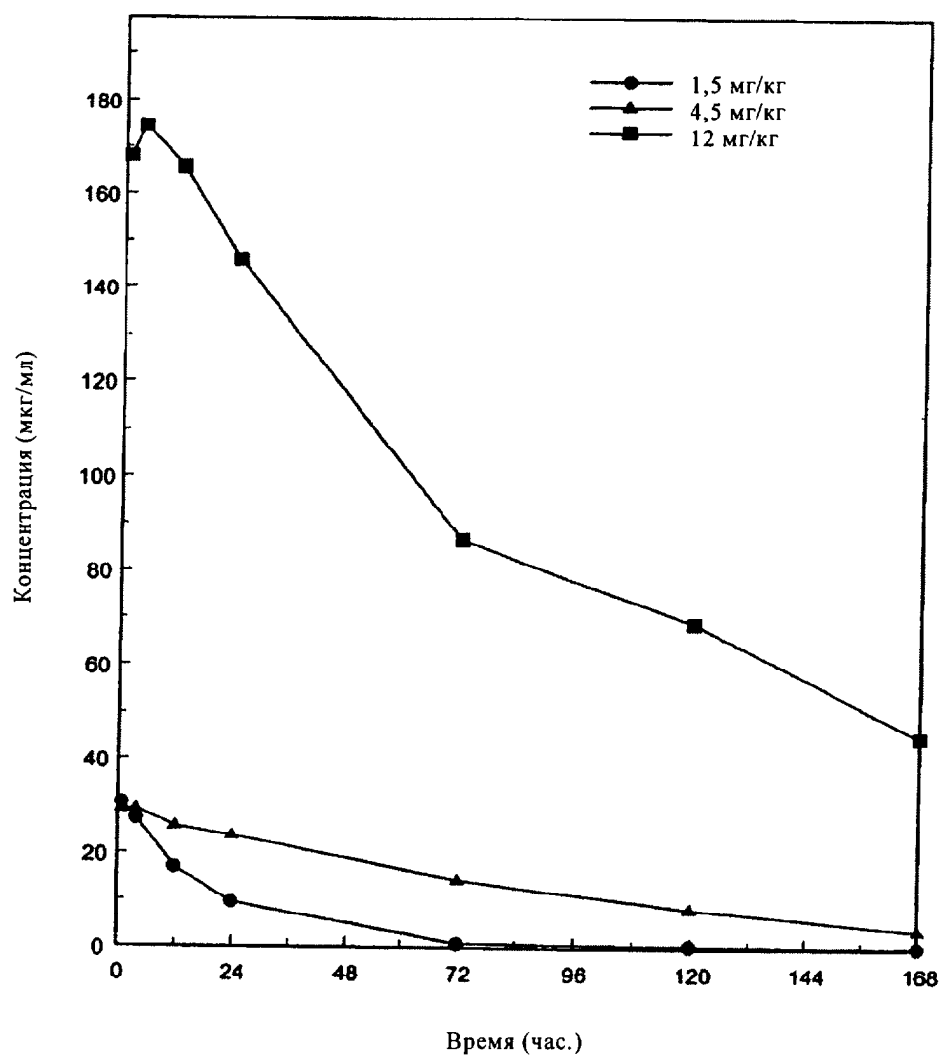
ФИГ. 17

Сывороточные концентрации антитела к EGFR в День 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самцу обезьяны макак-крабобед



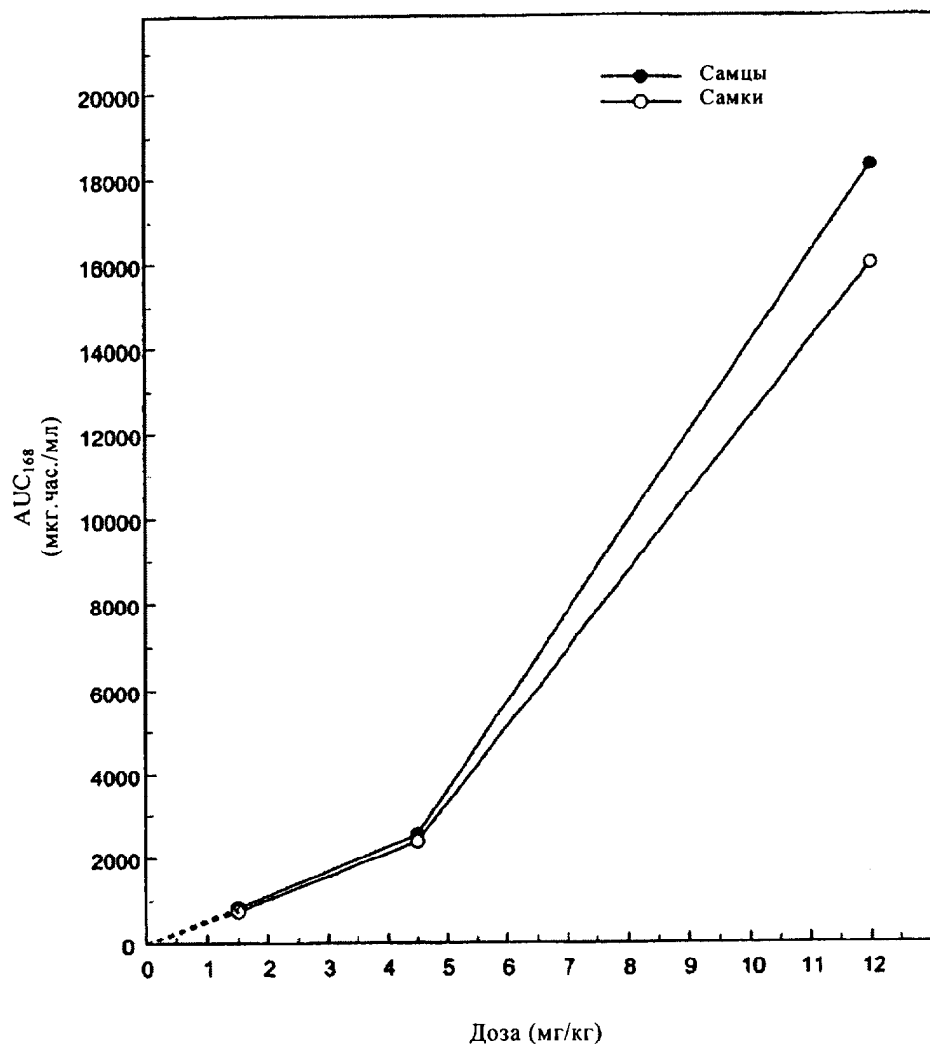
ФИГ. 18

Сывороточные концентрации антитела к EGFR в День 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самке обезьяны макак-крабоед



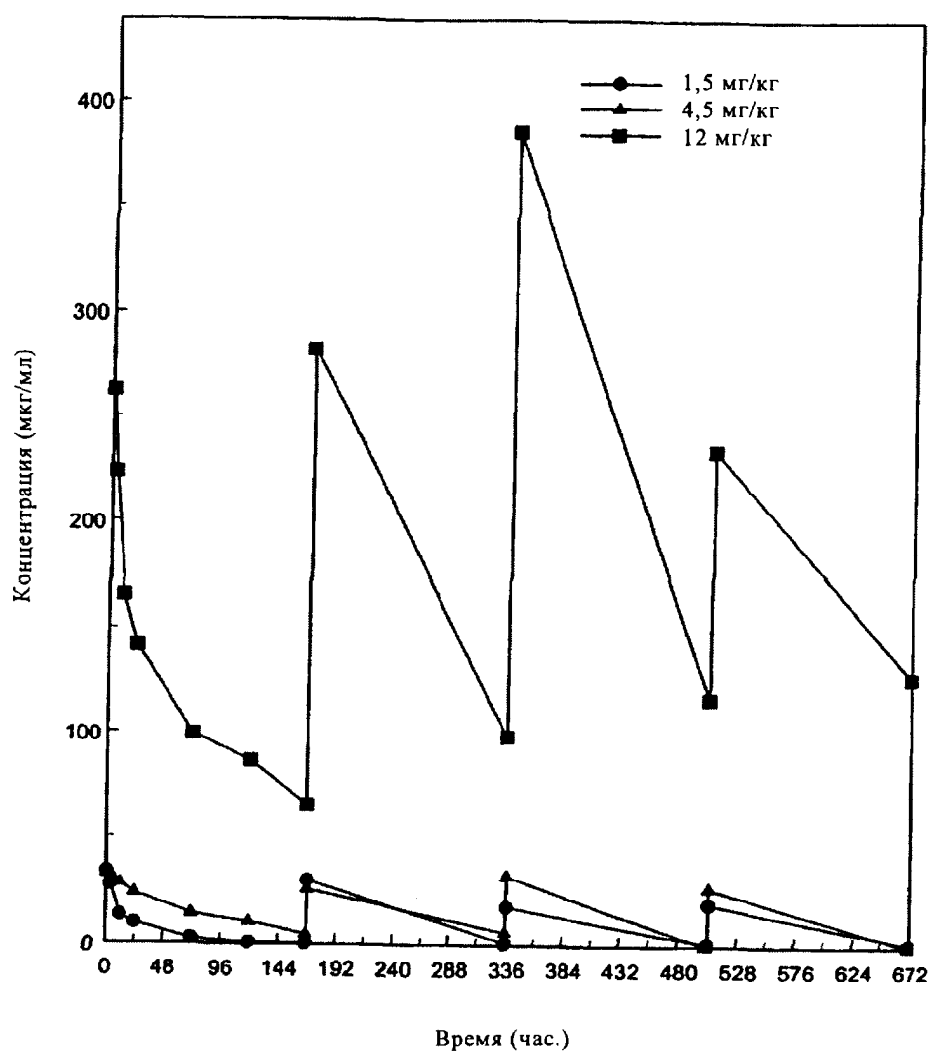
ФИГ. 19

Связь между площадями под кривыми зависимости сывороточной концентрации антитела к EGFR от времени (AUC_{168}) и уровнем дозы в День 1 еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR обезьян макак-крабоед



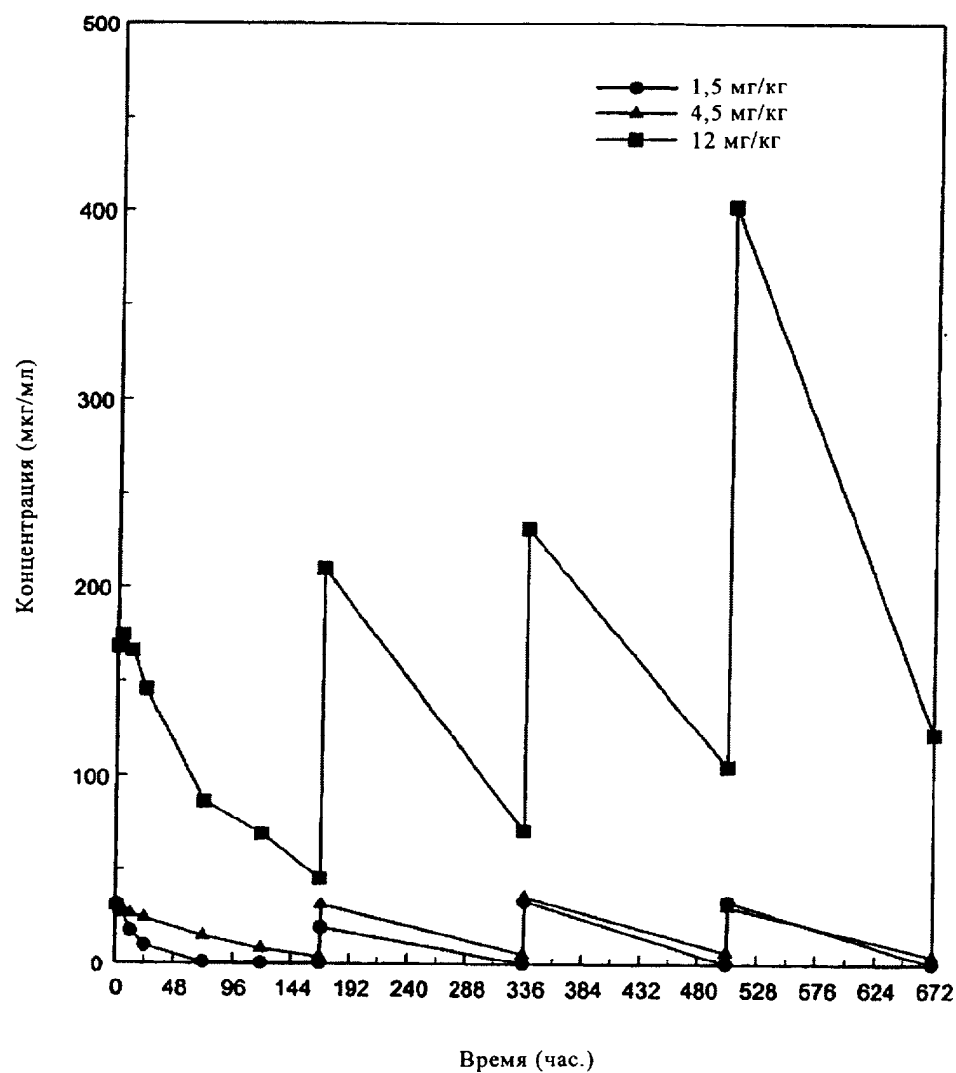
ФИГ. 20

Сывороточные концентрации антитела к EGFR в период еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самцу обезьяны макак-крабоед

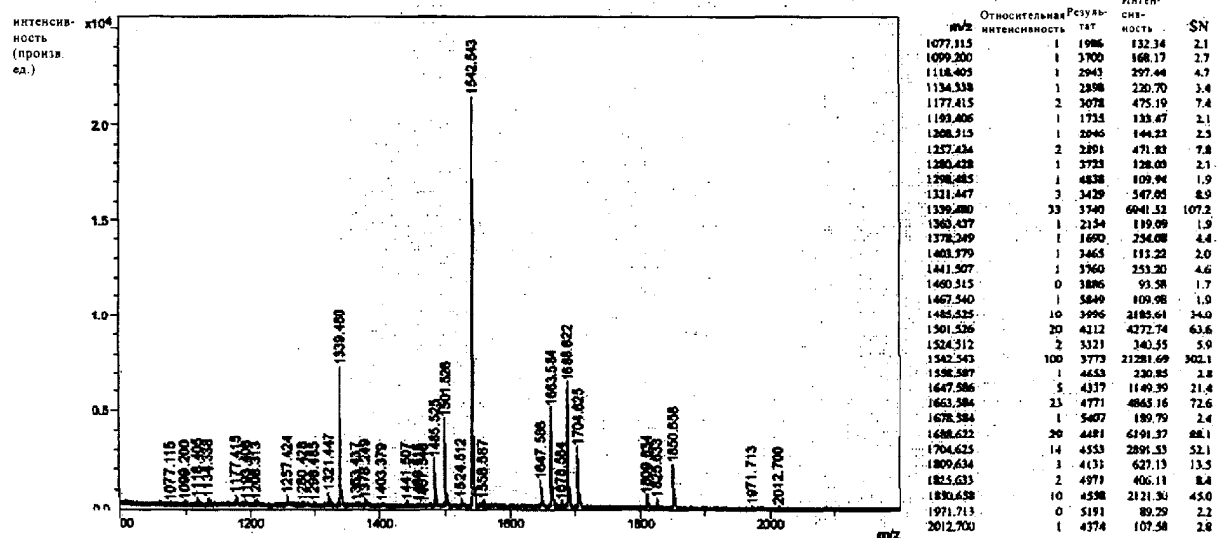


ФИГ. 21

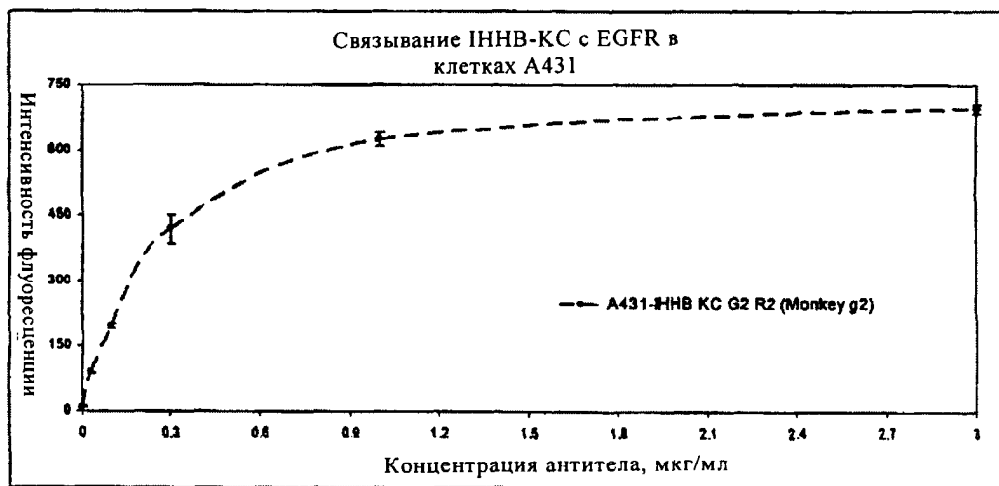
Сывороточные концентрации антитела к EGFR в период еженедельного внутривенного введения антитела к EGFR самке обезьяны макак-крабоед



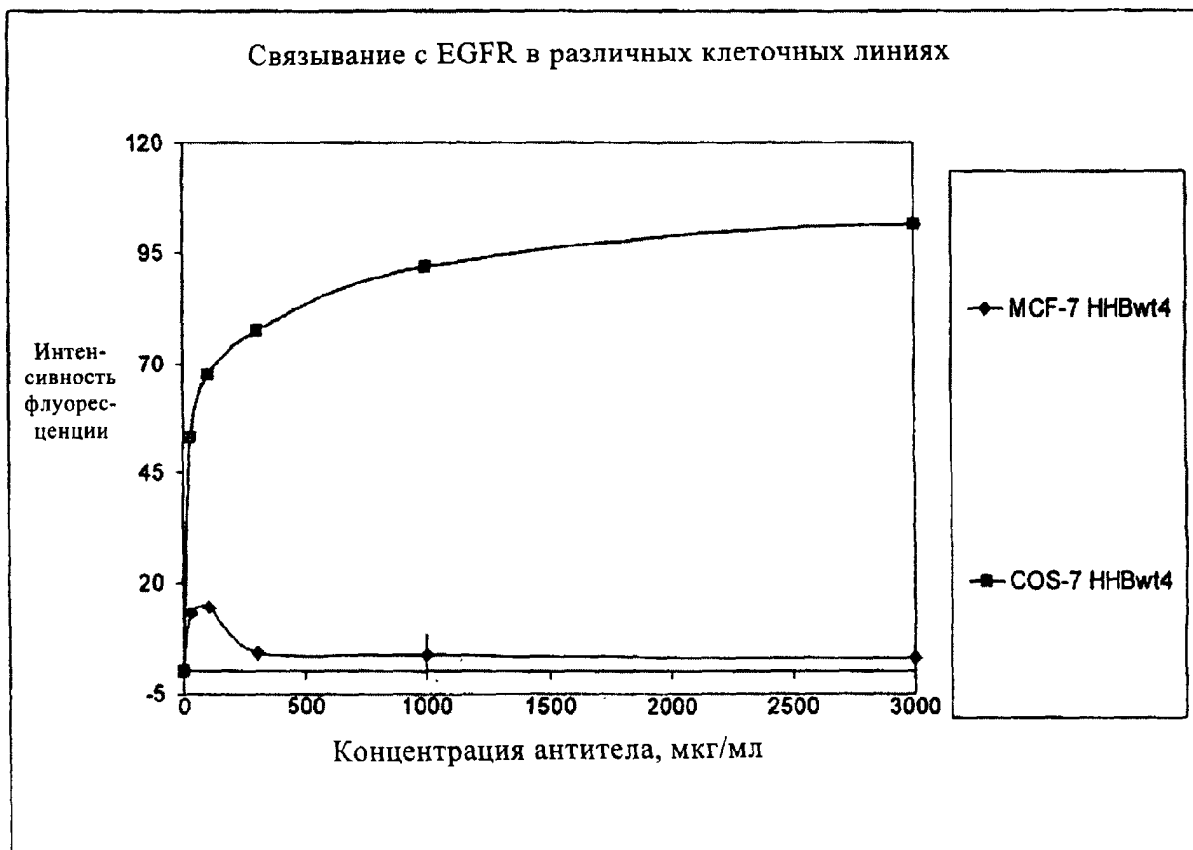
ФИГ. 22



ФИГ. 23

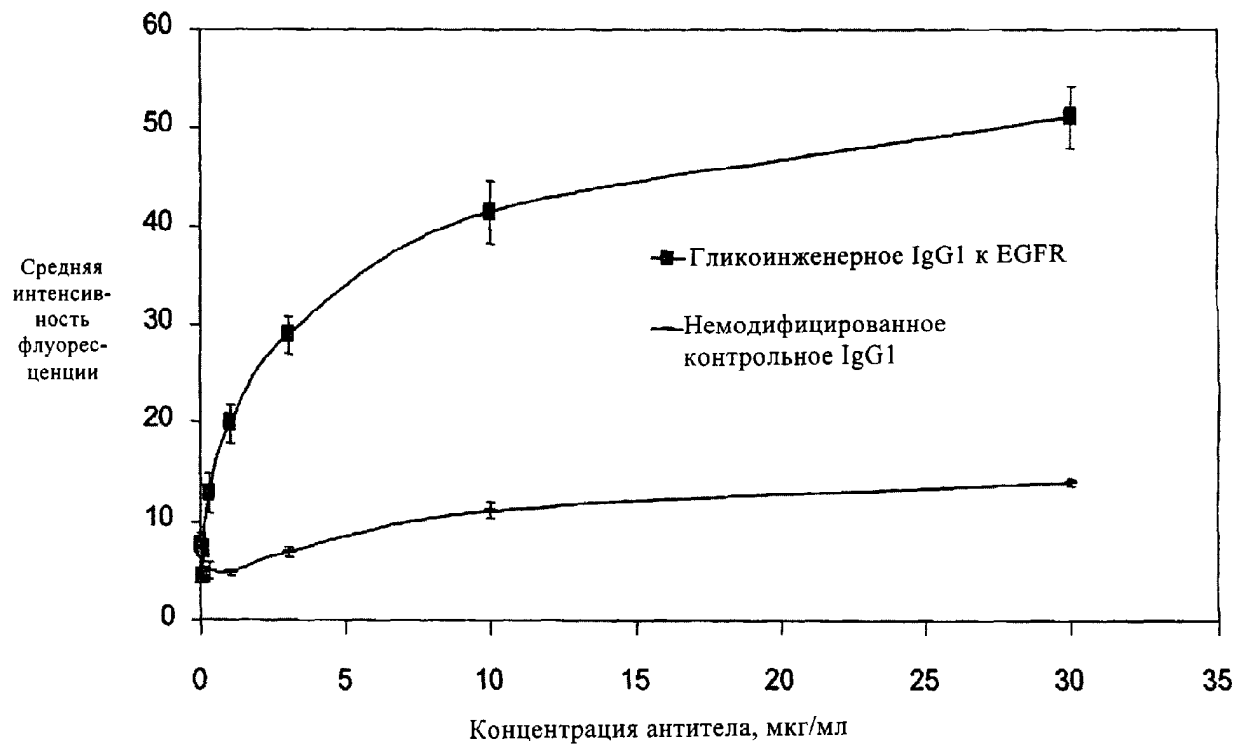


ФИГ. 24



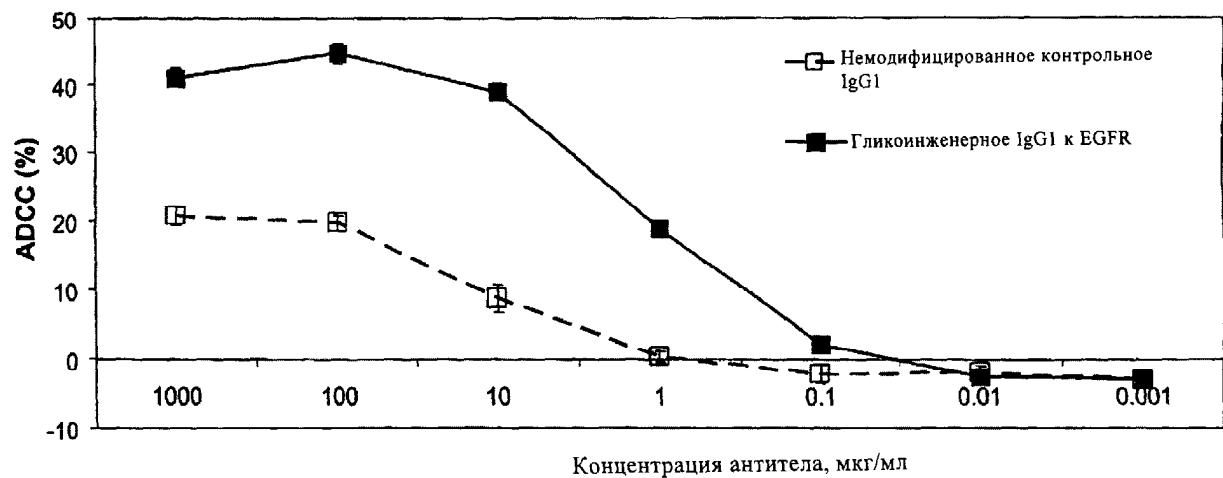
ФИГ. 25

Связывание FcR с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIa человека



ФИГ. 26

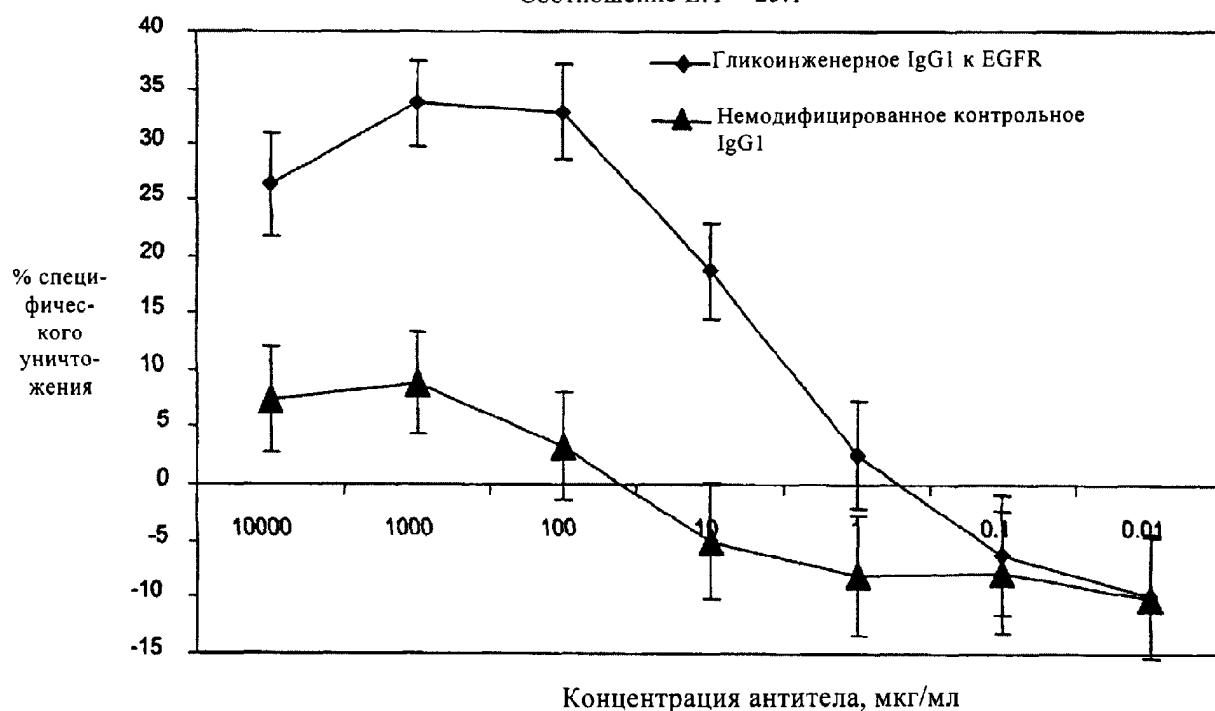
4-часовой анализ ADCC с использованием (Т)-клеток-мишеней A-549. ADCC измеряют методом на основе высвобождения ЛНВ. Эффекторы (Е) – РВМС человека. Соотношение Е:Т = 25:1



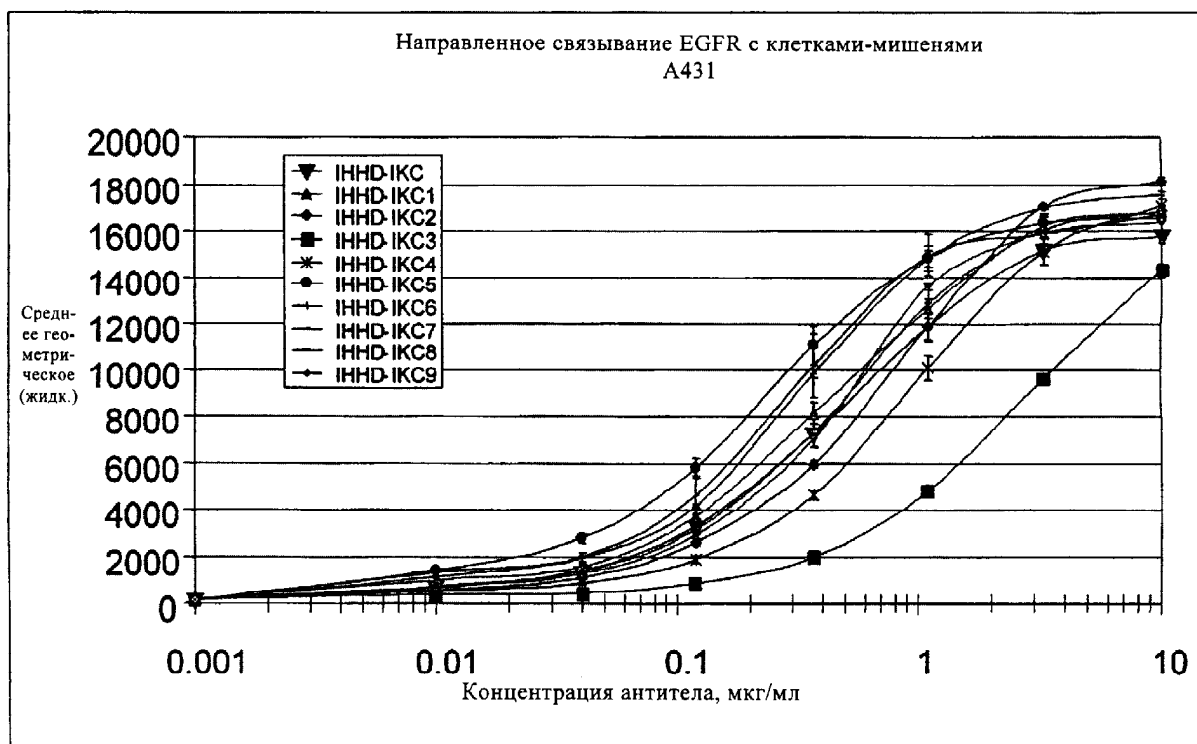
ФИГ. 27

4-часовой анализ ADCC с использованием (Т)-клеток-мишеней CYNOM-K1. ADCC измеряют методом на основе высвобождения ЛНВ. Эффекторы (Е) – РВМС человека.

Соотношение Е:Т = 25:1



ФИГ. 28



ФИГ. 29