

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036531**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.19

(21) Номер заявки
201300481

(22) Дата подачи заявки
2004.11.05

(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 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО ТИПА II К CD20 (ВАРИАНТЫ), ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭТИ ВАРИАНТЫ АНТИТЕЛА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 60/517,096

(32) 2003.11.05

(33) US

(43) 2014.01.30

(62) 201100128; 2004.11.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РОШЕ ГЛИКАРТ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Умана Пабло, Брюнкер Петер,
Феррара Клаудиа, Зутер Тобиас,
Пюнтенер Урсула, Мёсснер Эккехард
(CH)**

(74) Представитель:
**Кузенкова Н.В., Веселицкая И.А.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(56) WO-A2-2003068821

BY JAMES M. FORAN et al. European
Phase II Study of Rituximab (Chimeric Anti-CD20
Monoclonal Antibody) for Patients With Newly
Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma, and Small B-
Cell Lymphocytic Lymphoma, Journal of Clinical
Oncology, 2000, Vol. 18, No. 2, pp. 317-324
US-A1-20030175884

(57) В патенте описаны гуманизированные антитела, обладающие специфичностью в отношении человеческого CD20. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам с модифицированным гликозилированием, которые обладают улучшенными терапевтическими свойствами, включая антитела с повышенной способностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией. Изобретение также относится способам получения таких антител и способам их применения для уничтожения CD20-экспрессирующих клеток лимфомы и ингибирования роста клеток опухоли человека.

B1**036531****036531****B1**

Предпосылки создания изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам, а именно гуманизированным антителам, обладающим специфичностью в отношении человеческого CD20. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам с модифицированным гликозилированием, которые обладают улучшенными терапевтическими свойствами, включая антитела с повышенной способностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим эти антитела их применению.

Известный уровень техники

Иммунная система и антитела к CD20

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

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

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

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

Неконъюгированные моноклональные антитела (МАт) можно применять в качестве лекарственных средств для лечения рака, о чем свидетельствует разрешение Департамента по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (US Food and Drug Administration) применения ритуксимаба (Rituxan™; фирма IDEC Pharmaceuticals, Сан-Диего, шт. Калифорния, и фирма Genetech Inc., Сан-Франциско, шт. Калифорния) для лечения CD20-позитивной В-клеточной, низкоклеточной или фолликулярной неходжкинской лимфомы, трастузумаба (Herceptin™, фирма Genetech Inc.) для лечения развитого рака молочной железы (Grillo-Lopez A.-J и др., Semin. Oncol., 26, 1999, сс. 66-73; Goldenberg M.M., Clin. Ther., 21, 1999, сс. 309-318), ремтузумаба (Mylotarg™, фирма Genetech/Wyeth-Ayerst) для лечения рецидива острого миелоидного лейкоза и алемтузумаба (CAMPATH™, фирма Mille-

nium Pharmaceuticals/Schering AG) для лечения В-клеточного хронического лимфолейкоза. Успешное применение этих продуктов обусловлено не только их эффективностью, но и их очень хорошими профилями безопасности (Grillo-Lopez A.-J и др., *Semin. Oncol.*, 26, 1999, сс. 66-73; Goldenberg M.M., *Clin. Ther.*, 21, 1999, сс. 309-318). В свете успехов, связанных с этими лекарственными средствами, в настоящее время существует большая потребность в достижении более высокой специфической активности антител по сравнению с той, которая, как правило, обеспечивается при лечении с использованием неконъюгированного МАт. Другим антителом, обладающим специфичностью в отношении человеческого CD20, является мышиное моноклональное антитело B-Ly1 (Poppema S. и Visser L., *Biotest Bulletin*, 3, 1987, сс. 131-139).

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

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

Другой известный из литературы подход к усилению способности мышиных моноклональных антител оказывать действие при лечении связанных с В-клетками заболеваний заключался в осуществлении конъюгации радиоактивной метки или токсина с антителом так, чтобы метка или токсин оказались локализованными в области опухоли. Например, опубликованы данные о том, что указанное выше антитело 1F5 "метили" с помощью йода-131 (¹³¹I) и оценивали его биораспределение в организме двух пациентов (см. Eary J.F. и др., *Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma*, *J. Nuc. Med.* 31/8, 1990, сс. 1257-1268; см. также Press O.W. и др., *Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody*, *J. Clin. Onc.*, 7/8, 1980, сс. 1027-1038 (указано, что у одного подвергнувшегося лечению меченым с помощью ¹³¹I IF-5 пациента был достигнут "частичный ответ"); Goldenberg D.M. и др., *Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labelled LL2 Monoclonal Antibody*, *J. Clin. Onc.*, 9/4, 1991<548-564 (указано, что у трех из восьми пациентов, которым делали несколько инъекций, развился НАМА-ответ); Appelbaum F.R., *Radiolabelled Monoclonal Antibodies in the treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma*, *Hem./Onc. Clinics of N.A.*, 5/5, 1991, сс. 1013-1025 (обзорная статья); Press O.W. и др., *Radiolabelled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support*, *New England J. Med.*, 329/17, 1993, сс. 1219-1223 (меченные с помощью йода-131 антитела IF5 и B1 к CD20); Kaminski M.G. и др., *Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ¹³¹I Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody*, *New England J. Med.*, 329/7, 1993 (меченное с помощью йода-131 антитело B1 к CD20; ниже цитируется как "Kaminski"). Имеются данные о том, что осуществляли также конъюгацию токсинов (т.е. химиотерапевтических агентов, таких как доксорубицин или митомицин C) с антителами (см., например опубликованную заявку PCT WO 92/07466 (опубликованную 14 мая 1992)).

В качестве альтернативы "конъюгированным" антителам были разработаны химерные антитела, со-

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

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

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

Гликозилирование антител

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

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

Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях в константных областях тяжелых цепей, причем каждый изотип несет различный набор N-связанных углеводных структур,

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

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

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

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

Краткое изложение сущности изобретения

Принимая во внимание чрезвычайно большой терапевтический потенциал антител, которые обладают специфичностью связывания, присущей мышиному антителу B-Ly1, и у которых с помощью генной инженерии сконструирована схема гликозилирования с целью повышения аффинности к связыванию с Fc-рецептором и повышения эффекторной функции, при создании настоящего изобретения были получены варианты гуманизированных антител. Эффективность этих антител дополнительно повышены путем конструирования профиля гликозилирования Fc-области антитела. Таким образом, данное изобретение относится к гуманизированному антителу типа II к CD20, которое включает:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 46; и

(б) вариабельную область KV1 легкой цепи SEQ ID NO: 76, где указанное антитело имеет повышенное количество нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к подвергнутому гликоинжинерингу Fc участку.

Кроме того, изобретение относится к гуманизированному антителу типа II к CD20, которое включает:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 72; и

(б) вариабельную область KV1 легкой цепи SEQ ID NO: 76, где указанное антитело имеет повышенное количество нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к подвергнутому гликоинжинерингу Fc участку.

Еще одним объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для лечения В-клеточных расстройств, содержащая указанные антитела и фармацевтически приемлемый носитель

Наконец последним объектом раскрытого в данной заявке изобретения является применение заявленных антител для получения лекарственного средства для лечения В-клеточных расстройств.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения В-клеточным расстройством является В-клеточная лимфома.

Кроме того, в заявке раскрыто применение предложенных антител для получения лекарственного средства для лечения расстройств, которые можно излечить истощением В-клеток.

В предпочтительном варианте указанным расстройством, которое можно излечить истощением В-клеток, является неходжкинская лимфома или В-клеточная хроническая лейкоцитарная лейкемия.

При этом заявленные антитела могут иметь повышенное количество бисекционных нефукозиллированных олигосахаридов, присоединенных к указанному подвергнутому гликоинжинирингу Fc участку.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - нуклеотидная (SEQ ID NO: 3) и аминокислотная (SEQ ID NO: 1) последовательности V_H -области мышиного B-Ly1;

на фиг. 2 - нуклеотидная (SEQ ID NO: 4) и аминокислотная (SEQ ID NO: 2) последовательности V_L -области мышиного B-Ly1;

на фиг. 3 - связывание Rituximab® (○) и ch-B_Ly1 (Δ) с CD20 на клетках В-лимфомы линии Raji;

на фиг. 4 - В-клеточное истощение, вызываемое Rituximab® (◇) и ch-B-Ly1 (■) в цельной крови трех различных классов генотипа FcγRIIIa-158V/F: (А) цельная кровь, полученная от F/F-донора, гомозиготная по рецептору с низкой аффинностью; (Б) цельная кровь, полученная от F/V-донора, гетерозиготная по обладающему аффинностью рецептору; (В) цельная кровь, полученная от V/V-донора, гомозиготная по рецептору с высокой аффинностью;

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

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

на фиг. 7 - нуклеотидная и аминокислотная последовательности CDR мышиного антитела B-Ly1; (А) - предсказанные CDR V_H -области, (Б) - предсказанные CDR V_L -области;

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

на фиг. 9 - данные о связывании различных гуманизированных антител к CD20 с В-клетками линии Raji. Различия между конструкцией В-НН2 и конструкциями В-НЛ8 и В-НЛ11 сосредоточены в каркасных участках 1 и 2, причем все три CDR являются идентичными. В-НЛ8 и В-НЛ11 имеют последовательности FR1 и FR2, выведенные из человеческой варибельной области тяжелой цепи VH3, в то время как полный каркасный участок В-НН2 выведен из человеческой VH1. В-НЛ11 представляет собой производное В-НЛ8, имеющее одну мутацию Glu1Gln, где Gln представляет собой аминокислотный остаток в конструкции В-НН2. Это означает, что замена Glu1Gln не изменяет аффинность или интенсивность к связыванию. В-НН2 и В-НЛ8 различаются также 14 остатками FR, из которых один или несколько могут оказывать влияние на антигенсвязывающую способность рассматриваемого антитела;

на фиг. 10 - данные о связывании гуманизированного антитела к CD20 BHL4-KV1 с клетками мишени линии Raji. Конструкция BHL4 получена из антитела В-НН2 путем замены FR1 В-НН2 соответствующим участком последовательности VH145 человеческой зародышевой линии. Эта конструкция характеризуется существенно более низкой антигенсвязывающей способностью, несмотря на то, что она имеет отличные от исходной последовательности аминокислоты только в трех положениях в FR1. Эти остатки находятся в положениях 2, 14 и 30 (согласно нумерации Кэбота). Среди них наиболее сильное влияние, по-видимому, оказывает положение 30, поскольку оно является частью CDR1 согласно определению Хотиа (Chotia);

на фиг. 11 - сравнительные данные о связывающей способности В-НН1, В-НН2, В-НН3 и родительского антитела B-Ly1. Из представленных данных видно, что все Ат характеризуются близкими значениями EC_{50} , но конструкция В-НН1 связывается с более низкой интенсивностью/стехиометрией, чем варианты В-НН2 и В-НН3. В-НН1 отличается от В-НН2 и В-НН3 своими частично человеческими участками CDR1 и CDR2 (согласно определению Кэбота), а также полиморфизмом Ala/Thr в положении 28 (согласно нумерации Кэбота). Это указывает на то, что положение 28, полный CDR1 и/или полный CDR2 важны для взаимодействия антитело/антиген;

на фиг. 12 - сравнительные данные для В-НЛ1, В-НН1 и родительского антитела B-Ly1. Данные свидетельствуют о том, что конструкция В-НЛ1 совсем не обладает связывающей активностью, а связывающая интенсивность/стехиометрия В-НН1 примерно в два раза меньше, чем B-Ly1. Как В-НЛ1, так и

В-НН1 сконструированы на основе акцепторных каркасов, выведенных из переменных областей человеческой тяжелой цепи VH1-класса. Среди других различий наиболее значительным является различие в положении 71 (согласно нумерации Кэбота) конструкции В-НЛ1, что свидетельствует о его возможном важном значении для связывания с антигеном;

на фиг. 13 - флуороцитометрический анализ антигенсвязывающей способности антитела к CD20. Данные свидетельствуют о том, что конструкции В-НЛ2 и В-НЛ3 не обладают CD-20-связывающей активностью;

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

на фиг. 15 - данные об апоптозе, индуцируемом антителом к CD20. Детали анализа: высевали 5×10^5 клеток/лунку в 24-луночные планшеты (5×10^5 клеток/мл) в культуральную среду. В лунки добавляли 10 мг соответствующего Ат, ЗФР в качестве негативного контроля или 5мМ камптотецин (CPT) в качестве позитивного контроля. Образцы инкубировали в течение ночи (16 ч), окрашивали с помощью AnnV-ФИТЦ и анализировали с помощью FACS. Анализ осуществляли в 3-х повторностях. (*): вычитали сигнал, соответствующий только ЗФР (применение только ЗФР приводило к появлению 8% и 2% AnnV+ для PR-1- и Z-138-клеток соответственно). Использовали следующие антитела: C2B8 (химерное, не имеющее сконструированную схему гликозилирования; BНН2-KV1 (гуманизированное, не имеющее сконструированную схему гликозилирования). Примечание: в этом анализе не применяли какие-либо дополнительные эффекторные клетки, а только клетки-мишени плюс антитело или контроль;

на фиг. 16 - данные об уничтожении клетки-мишени антителами к CD20 с помощью иммунокомпетентных эффекторных клеток. Детали анализа: В-клеточное "истощение" в цельной крови здоровых доноров осуществляли путем инкубации в течение ночи и анализировали в отношении CD19+/CD3+ с помощью FACS. ADCC оценивали с использованием РВМС в качестве эффекторов, инкубация в течение 4 ч, соотношение эффектора: мишени 25:1, уничтожение клеток-мишеней оценивали по удерживанию кальцеина по сравнению с лизисом с помощью детергента (100%) и с лизисом без Ат (0%). Применяемые антитела: C2B8 (химерная, не имеющая сконструированную схему гликозилирования форма); BНН2-KV1-wt (гуманизированная, не имеющая сконструированную схему гликозилирования форма BНН2-KV1); BНН2-KV1-GE (гуманизированная, имеющая сконструированную схему гликозилирования форма антитела BНН2-KV1);

на фиг. 17 - MALDI/TOF-МС-профиль выделившихся после обработки PNGазойF Fc-олигосахаридов (олигосахаридов из Fc-области) немодифицированного, не имеющего сконструированную схему гликозилирования гуманизированного IgG1 B-ly1 антитела к человеческому CD20, BНН2-KV1;

на фиг. 18 - MALDI/TOF-МС-профиль выделившихся после обработки PNGазойF Fc-олигосахаридов имеющего сконструированную схему гликозилирования гуманизированного IgG1 B-ly1 антитела к человеческому CD20, BНН2-KV1g1. Конструирование схемы гликозилирования осуществляли путем совместной экспрессии в клетках-хозяевах генов антител и гена, кодирующего фермент с каталитической активностью β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III);

на фиг. 19 - MALDI/TOF-МС-профиль выделившихся после обработки PNGазойF Fc-олигосахаридов имеющего сконструированную схему гликозилирования гуманизированного IgG1 B-ly1 антитела к человеческому CD20, BНН2-KV1g2. Конструирование схемы гликозилирования осуществляли путем совместной экспрессии в клетках-хозяевах генов антител и генов, кодирующих фермент с каталитической активностью β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III) и кодирующих фермент с каталитической активностью α -маннозидазы II комплекса Гольджи;

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

на фиг. 21- данные об апоптозе не имеющих сконструированную Fc-область и имеющих сконструированную Fc-область антител к CD20 на моноклональных клетках линии Z-138. Детали анализа: высевали 5×10^5 клеток/лунку в 24-луночные планшеты (5×10^5 клеток/мл) в культуральной среде. В лунки добавляли 10 мг соответствующего Ат, ЗФР в качестве негативного контроля. Образцы инкубировали в течение ночи (16 ч), окрашивали с помощью AnnV-ФИТЦ и анализировали с помощью FACS. Анализ осуществляли в 3 повторностях. Применяемые Ат: C2B8 = ритуксимаб (химерная не имеющая сконструированную схему гликозилирования форма, аналогичная поступающей в продажу форме; BНН2-KV1 (гуманизированное не имеющее сконструированную схему гликозилирования (см. на фиг. 6 профиль гликозилирования); BНН2-KV1g1 (гуманизированное имеющее сконструированную схему гликозилирования (см. на фиг. 7 профиль гликозилирования); BНН2-KV1g2 (гуманизированное не имеющее сконструированную схему гликозилирования (см. на фиг. 8 профиль гликозилирования). Примечание: в этом анализе не применяли какие-либо дополнительные эффекторные клетки, а только клетки-мишени плюс антитело или контроль. (*): Вычитали сигнал, соответствующий только ЗФР.

Подробное описание изобретения

Понятия, применяемые в контексте настоящего описания, соответствуют общепринятым в данной

области, если не указано иное.

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

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

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

В контексте настоящего описания понятие "антитело" относится к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. Более конкретно понятие "антитело, которое связывает CD20" обозначает молекулу, которая специфически связывается с находящемся на клеточной поверхности негликозилированным фосфопротеином с молекулярной массой 35000 Да, который обычно называют консервативным дифференцировочным антигеном человеческих В-лимфоцитов Bp35, который, как правило, называют CD20. Понятие "специфически связывается" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий.

В контексте настоящего описания понятия "слитый" и "химерный" касательно антител относится к полипептидам, которые содержат аминокислотные последовательности, выведенные из двух или большего количества гетерологичных полипептидов, таких как фрагменты антител из различных видов. Для химерных АСМ, например, несвязывающие антиген компоненты можно получать из широкого разнообразия видов, включая приматов, таких как шимпанзе и люди. Константная область химерного антитела наиболее предпочтительно является практически идентичной константной области встречающегося в естественных условиях человеческого антитела; переменная область химерного антитела наиболее предпочтительно практически идентична переменной области рекомбинантного антитела к CD-20, которое имеет аминокислотную последовательность переменной области мышиного антитела B-Ly1. Гуманизированные антитела являются наиболее предпочтительной формой слитого или химерного антитела.

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

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

минимизируя количество замен в аминокислотной последовательности в областях высокой гомологии (консервативные области), или путем замены аминокислот консенсусной последовательностью.

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

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

В контексте настоящего описания понятие "гуманизированный" относится к антителу, полученному из антитела из организма кроме человека, например, к мышинному антителу, которое сохраняет или практически сохраняет антигенсвязывающие свойства родительской молекулы, но которое является менее иммуногенным для людей. Это можно достигать с помощью различных методов, которые включают (а) трансплантацию полных нечеловеческих переменных областей в человеческие константные области с получением химерных антител, (б) трансплантацию нечеловеческих CDR в человеческие каркасные и константные области с сохранением имеющих решающее значение остатков каркасного участка (например остатков, важных для сохранения хорошей аффинности к связыванию антигена или функций антитела) или без их сохранения, или (в) трансплантацию полных нечеловеческих переменных областей, но с их "маскировкой" участком, напоминающим человеческий, путем замены находящихся на поверхности остатков. Такие методы описаны у Jones и др., Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, Adv. Immunol., 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeven и др., Science, 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, Molec. Immun., 28, 1991, сс. 489-498; Padlan, Molec. Immun., 31(3), 1994, сс. 169-217, все указанные публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. В каждой из переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела присутствует 3 гиперпеременных участка или CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), которые фланкированы четырьмя каркасными подобластями (участками) (т.е., FR1, FR2, FR3 и FR4) в каждой из переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Обсуждение гуманизированных антител представлено среди прочего в U.S. 6632927, и в опубликованной заявке на патент США №. 2003/0175269, оба документа полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Аналогично этому, в контексте настоящего описания понятие "приматизированный" относится к антителу, полученному из антитела организма кроме примата, например, мышинному антителу, которое сохраняет или практически сохраняет антигенсвязывающие свойства родительской молекулы, но которое является менее иммуногенным для приматов.

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

гут определить, какие остатки входят в конкретный CDR, на основе данных об аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Таблица 1. Определения CDR

	Кэбот	Хотиа	АСМ
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	
V _L CDR2	50-56	50-52	
V _L CDR3	89-97	91-96	

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

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

В контексте настоящего описания понятие "нуклеиновая кислота или полинуклеотид, имеющие нуклеотидную последовательность по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" нуклеотидной последовательности, с которой проводят сравнение (референс-последовательность)". Это означает, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, можно изымать путем делеции или заменять другими нуклеотидами вплоть до 5% нуклеотидов референс-последовательности или вплоть до 5% от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эталонная последовательность может представлять собой полную последовательность, представленную на фиг. 24 или 25.

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

Если анализируемая последовательность короче эталонной последовательности вследствие наличия делеций на 5'- или 3'-конце, но не вследствие внутренних делеций, то результаты можно скорректировать вручную. Это обусловлено тем, что программа FASTDB не учитывает укорочения на 5'- и 3'-конце анализируемой последовательности при расчете процента идентичности. Для анализируемых последовательностей, укороченных на 5'- или 3'-концах по отношению к эталонной последовательности процент идентичности корректируют путем вычисления количества оснований эталонной последовательности, расположенных за 5'- и 3'-концами анализируемой последовательности, которые не совпали/не проанализированы, в виде процента от общего количества оснований эталонной последовательности. Совпадают ли/проанализированы ли нуклеотиды, определяется результатами сравнительного анализа последовательностей с помощью программы FASTDB. Затем этот процент вычитают из процента идентичности, рассчитанного с помощью указанной выше программы FASTDB с использованием указанных заданных

параметров, в результате чего получают окончательную оценку процента идентичности. Для целей ручной коррекции оценки процента идентичности рассчитывают только основания, расположенные за 5'- и 3'-концами анализируемой последовательности, выявленные с помощью сравнительного анализа с использованием программы FASTDB, которые не совпадали/не проанализированы с эталонной последовательностью.

Например, для определения процента идентичности анализируемую последовательность длиной 90 оснований сравнивают с эталонной последовательностью длиной 100 оснований. На 5'-конце анализируемой последовательности имеются делеции и поэтому сравнительный анализ с помощью FASTDB не позволяет устанавливать совпадения/анализировать 10 первых оснований на 5'-конце. 10 неспаренных оснований представляют собой 10% последовательности (количество несовпавших оснований на 5'- и 3'-концах/общее количество оснований в эталонной последовательности), таким образом, 10% вычитают из оценки процента идентичности, рассчитанного с помощью программы FASTDB. Если остальные 90 оснований идеально совпадают, то окончательный процент идентичности составляет 90%. В другом примере анализируемую последовательность длиной 90 оснований сравнивают с эталонной последовательностью длиной 100 оснований. В данном случае делеции представляют собой внутренние делеции, так что на 5'- или 3'-конце анализируемой последовательности не имеется оснований, которые не совпадали/не проанализированы с эталоном. В этом случае процент идентичности, рассчитанный с помощью программы FASTDB, не корректируют вручную. Еще раз следует подчеркнуть, что вручную осуществляют коррекцию только для оснований, которые не совпали/не проанализированы на 5'- и 3'-концах анализируемой последовательности. Подразумевается, что у полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" эталонной аминокислотной последовательности, аминокислотная последовательность идентична эталонной последовательности за исключением того, что анализируемая последовательность полипептида может иметь вплоть до пяти аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот эталонной последовательности. Другими словами для того, чтобы получить полипептид, аминокислотная последовательность которого, по меньшей мере на 95% идентична эталонной аминокислотной последовательности, можно встраивать, изымать путем делеции или заменять другой аминокислотой вплоть до 5% аминокислотных остатков анализируемой последовательности. Эти изменения по сравнению с референс-последовательностью могут иметь место в N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом положении между этими концами, в виде изменений, либо распределенных индивидуально между остатками референс-последовательности, либо в виде одной или нескольких непрерывных групп в референс-последовательности.

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

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

тельном анализе с эталонной последовательностью. Т.е. учитывают только положения эталонных остатков вне наиболее удаленных N- и C- концевых остатков анализируемой последовательности.

Например, для определения процента идентичности анализируемую аминокислотную последовательность, содержащую 90 остатков, сравнивают с эталонной последовательностью, содержащей 100 остатков. На N'-конце анализируемой последовательности имеются делеции и поэтому сравнительный анализ с помощью FASTDB не позволяет устанавливать совпадения при сравнительном анализе для 10 первых остатков на N'-конце. 10 несовпавших остатков представляют собой 10% последовательности (количество несовпавших остатков на N'- и C'-концах/общее количество остатков в эталонной последовательности), таким образом, 10% вычитают из оценки процента идентичности, рассчитанного с помощью программы FASTDB. Если остальные 90 остатков идеально совпадают, то окончательный процент идентичности составляет 90%. В другом примере анализируемую последовательность, содержащую 90 остатков, сравнивают с эталонной последовательностью, содержащей 100 остатков. В данном случае делеции представляют собой внутренние делеции, так что на N'- или C'-конце анализируемой последовательности не имеется остатков, которые не совпадают при сравнительной анализе с эталоном. В этом случае процент идентичности, рассчитанный с помощью программы FASTDB, не корректируют вручную. Еще раз следует подчеркнуть, что вручную осуществляют коррекцию только для несовпавших/не проанализированных остатков на N'- и C'-концах анализируемой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нуклеиновая кислота, которая "гибридуется в строгих условиях" с нуклеотидной последовательностью относится к полинуклеотиду, который гибридизуется при инкубации в течение ночи при 42°C в растворе, содержащем 50% формамида, 5×SSC (750 mM NaCl, 75 mM цитрат натрия), 50 mM фосфат натрия (pH 7,6), 5× раствор Денхардта, 10% сульфата декстрана и 20 мкг/мл недатурированной, гидродинамически фрагментированной ДНК из спермы лосося, с последующей отмывкой фильтров в 0,1×SSC примерно при 65°C.

В контексте настоящего описания понятие "домен локализации в комплексе Гольджи" относится к аминокислотной последовательности расположенного в комплексе Гольджи полипептида, который ответствен за "заякоривание" полипептида в области внутри комплекса Гольджи. Как правило, домены локализации содержат аминоконцевые "хвосты" фермента.

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

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

Кроме того, конструирование схемы гликозилирования включает воздействия мутаций и клеточного окружения на гликозилирование.

В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любой клеточной системе, которую можно сконструировать для производства полипептидов и антигенсвязывающих молекул. Клетку-хозяина можно конструировать так, чтобы с ее помощью получать антитело с модифицированными гликоформами. Их также можно подвергнуть дополнительным манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих GnTIII-активностью. Клетки-хозяева представляют собой культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как CHO-клетки, BHK-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышиной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и растительные клетки, а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" относится к антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и клеточнозависимой, опосредованной растворимым слитым с Fc белком, который содержит человеческую Fc-область. Это представляет собой механизм иммунитета, приводящий к лизису "меченных антителом клеток" "человеческими иммунокомпетентными эффекторными клетками", где понятие "человеческие иммунокомпетентные эффекторные клетки" означает популяцию лейкоцитов, несущих на поверхности Fc-рецепторы, с помощью которых они связываются с Fc-областью антител или слитыми с Fc белками и осуществляют эффекторные функции. Такая популяция может включать (но, не ограничиваясь ими) пе-

риферические моноклеарные клетки (PBMC) и/или естественные клетки-киллеры (NK).

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

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

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

1) для анализа применяют клетки-мишени, для которых известно, что они экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антигенсвязывающим центром антитела;

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

3) анализ осуществляют с помощью следующего протокола:

I) PBMC выделяют с помощью стандартных методов центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют 5×10^5 клеток/мл в RPMI-среде для культуры клеток;

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

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

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

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

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

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

VIII) добавляют в каждую лунку по 50 мкл суспензии PBMC (указанной в п.I, выше), получая соотношение эффекторная клетка: клетка-мишень 25:1, и планшеты помещают в инкубатор в атмосферу 5% CO_2 и выдерживают при 37°C в течение 4 ч;

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

X) рассчитывают процент специфического лизиса для каждой концентрации антитела согласно формуле $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, где ER обозначает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п.IX, выше) для указанной концентрации антитела, MR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п.IX, выше) для MR-контролей (см. п.V, выше), а SR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п.IX, выше) для SR-контролей (см. п.VI, выше); "Повышенную ADCC" определяют либо как увеличение максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций антитела, и/или как снижение концентрации антитела, необходимой для достижения $1/2$ максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона

концентраций антитела. Повышение ADCC оценивают относительно ADCC, опосредованной одним и тем же антителом, продуцированным в одном и том же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но которое не продуцировалось клеткой-хозяином, сконструированной для сверхэкспрессии GnTIII.

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

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

Настоящее изобретение является первым известным примером создания антитела типа II к CD20, которое обладает повышенными эффекторными функциями, такими как ADCC, сохраняя при этом способность, индуцировать эффективный апоптоз. Таким образом, настоящее изобретение относится к сконструированному антителу типа II к CD20, которое обладает повышенной ADCC, что является результатом указанного конструирования, и не утрачивает выраженную способность индуцировать апоптоз. Сконструированы антитела типа II к CD20, которые имели измененную схему гликозилирования в Fc-области измененное гликозилирование предусматривает повышенный уровень бисекционных комплексных остатков в Fc-области. Измененное гликозилирование также предусматривает понижение уровня остатков фукозы в Fc-области (см. опубликованную заявку на патент США № 20040093621 на имя фирмы Shitara и др., содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Антитела типа II к CD20 можно создавать с помощью метода конструирования полипептидов, который изложен в U.S. 6737056 на имя Presta или в опубликованной заявке на патент США № 20040185045 (на имя Macrogenics) или в опубликованной заявке на патент США № 20040132101 (на имя Хенсор), содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Известны химерные мышиные /человеческие антитела (см., например, Morrison S. L. и др., *PNAS* 11, ноябрь 1984 г., сс. 6851-6854; опубликованный европейский патент № 173494; Boulianna G. L и др., *Nature* 312, декабрь 1984 г., с. 642; Neubeiger M. S. и др., *Nature* 314, март 1985 г., с. 268; опубликованный европейский патент № 125023; Tan и др., *J. Immunol.* 135, ноябрь 1985 г., с. 8564; Sun L. K и др., *Hybridoma* 5(1), 1986, с.517; Sahagan и др., *J. Immunol.* 137, 1986, сс. 1066-1074). Общие сведения приведены у Muron, *Nature* 312, декабрь 1984 г., с. 597; Dickson, *Genetic Engineering News* 5(3), март 1985 г.; Marx, *Science* 229, август 1985 г., с. 455; и Morrison, *Science* 229, сентябрь 1985 г., сс. 1202-1207. Robinson с соавторами в опубликованной заявке PCT WO/88104936 описали химерное антитело, которое несет человеческую константную область и мышиную вариабельную область, обладающее специфичностью в отношении эпитопа CD20; мышиный фрагмент химерного антитела по данным Robinson выведен из мышиного моноклонального антитела 2H7 (гамма 2b, каппа). Несмотря на то, что в указанной ссылке это химерное антитело рассматривается в качестве "основного кандидата" для лечения В-клеточных нарушений, специалисты в данной области могут рассматривать его только как гипотетичное при определении того, справедливо ли оно для конкретного антитела, прежде всего из-за того, что в ссылке отсутствуют какие-либо данные, подтверждающие утверждение о наличии терапевтической эффективности, и, что является важным, результаты, полученные с использованием высших млекопитающих, таких как приматы или люди.

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

Химерное антитело может быть гуманизированным антителом. Методы гуманизации антител, по-

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

Выбор человеческих вариабельных областей как легкой, так и тяжелой цепи, применяемых для создания гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности. Согласно так называемому методу "наилучшего подбора" последовательность вариабельной области антитела грызунов подвергают скринингу с использованием полной библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных областей. Затем человеческую последовательность, наиболее сходную с последовательностью грызунов, отбирают в качестве человеческого каркасного участка (FR) для создания гуманизированного антитела (Sims и др., *J. Immunol.*, 151, 1993, с. 2296; Chothia и др., *J. Mol. Biol.*, 196, 1987, с. 901). Другой метод выбора последовательности человеческого каркасного участка заключается в сравнении последовательности каждой индивидуальной подобласти полного каркасного участка грызунов (т.е., FR1, FR2, FR3 и FR4) или определенной комбинации индивидуальных подобластей (например FR1 и FR2) и библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных областей, которые соответствуют указанной каркасной подобласти (например с использованием нумерации по Кэботу), и выборе человеческой последовательности для каждой подобласти или комбинации, которая является наиболее сходной с последовательностью грызунов (Leung, заявка на патент США № 2003/0040606A1, опубликованная 27 февраля 2003 г.). Еще один метод основан на применении конкретного каркасного участка, выведенного из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких и тяжелых цепей. Один и тот же каркасный участок можно применять для нескольких различных гуманизированных антител (Carter и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, с. 4285; Presta и др., *J. Immunol.*, 151, 1993, с. 2623).

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

Антитела с повышенной аффинностью к связыванию конструируют, например, с использованием методов, описанных в опубликованной заявке на патент США № 2004/0132066 на имя Balint и др., полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Их можно также конъюгировать с дополнительным фрагментом, таким как радиоактивная метка или токсин. Такие конъюгированные антитела можно получать многочисленными методами, хорошо известными в данной области.

При этом можно применять различные радионуклиды и специалисты в данной области могут легко определить, какой радионуклид является наиболее пригодным в различных ситуациях. Например, ¹³¹йод представляет собой хорошо известный радионуклид, применяемый для целенаправленной иммунотерапии. Однако клиническая применимость ¹³¹йода может быть ограничена несколькими факторами, которые включают: восьмидневный физический период полураспада; дегалогенизация йодированного анти-

тело, как в крови, так и в областях опухоли; и характеристики испускания (например, высокий уровень гамма-компонента), что может оказаться не оптимальным для локализованного отложения дозы в опухоли. С появлением более эффективных хелатирующих агентов возможность присоединения к белкам хелатирующих групп металлов повысила возможность использования других радионуклидов, таких как ^{111}In индия и ^{90}Y иттрия. ^{90}Y Иттрия обладает рядом преимуществ при радиоиммунотерапевтическом применении: 64-часов период полураспада ^{90}Y иттрия является достаточным для накопления антитела опухолью и, например, в отличие от ^{131}I йода, ^{90}Y иттрия испускает только бета-лучи высокой энергии без накопления гамма-излучения при его распаде на участке ткани, диаметром 100-1000 клеток. Кроме того, минимальное количество проникающей радиации позволяет вводить антитела, меченные ^{90}Y иттрием, амбулаторным больным. Для уничтожения клетки не требуется интернализация меченого антитела, и местное испускание ионизирующего излучения должно быть летальным для примыкающих опухолевых клеток, лишенных антигена-мишени.

Эффективные однократные дозы (т.е., терапевтически эффективные количества) меченных с помощью ^{90}Y иттрия антител к CD20 составляют от примерно 5 и до примерно 75 мКи, более предпочтительно от примерно 10 до примерно 40 мКи. Эффективные однократные неаблятивные дозы (при использовании которых не требуется трансплантация костного мозга), меченных с помощью йода антител к CD20 составляют от примерно 5 и до примерно 70 мКи, более предпочтительно от примерно 5 и до примерно 40 мКи. Эффективные однократные аблятивные дозы (т.е. при применении которых может потребоваться аутологичная трансплантация костного мозга) меченных с помощью йода антител к CD20 составляют от примерно 30 и до примерно 600 мКи, более предпочтительно от примерно 50 и менее чем примерно 500 мКи. С учетом того, что химерное антитело к CD20 обладает более продолжительным периодом полужизни в кровотоке по сравнению с мышиными антителами, эффективные однократные неаблятивные дозы (при использовании которых не требуется трансплантация костного мозга) меченных с помощью ^{131}I йода химерных антител к CD20 составляют от примерно 5 и до примерно 40 мКи, более предпочтительно менее чем примерно 30 мКи. Критерии визуализации, например, в случае использования в качестве метки ^{111}In индия, как правило, составляют менее примерно 5 мКи.

При лечении с использованием радиоактивно меченных антител к CD20 можно использовать как однократную терапевтическую обработку, так и несколько обработок. Из-за присутствия радионуклидного компонента предпочтительно, чтобы перед лечением периферические стволовые клетки ("PSC") или клетки костного мозга ("BM") были "собраны" с целью оценки их способности к выживанию в присутствии потенциально смертельной для костного мозга токсичности радиации. BM и/или PSC выделяют стандартными методами и затем очищают и замораживают для возможной реинфузии. Кроме того, наиболее предпочтительно перед лечением проводить диагностическое дозиметрическое исследование пациента с помощью диагностического меченого антитела (например, с помощью ^{111}In индия), целью которого является гарантия того, что терапевтическое меченое антитело (например, с помощью ^{90}Y иттрия) не концентрируется в излишнем количестве в любом здоровом органе или ткани.

Полинуклеотид может содержать последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая представлена ниже в табл. 3. Выделенная нуклеиновая кислота может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая представлена ниже в табл. 2. Она также может содержать последовательность, которая кодирует полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в табл. 3. Выделенная нуклеиновая кислота помимо последовательности, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность любой из представленных в табл. 3 конструкций, может включать консервативные аминокислотные замены.

Таблица 2

Конструкция	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAGCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>TGGGGATACTGACTACGCACAGAAAATCCAAGG</u> <u>AAGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	29
B-HH2	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	31
B-HH3	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	33
B-HH4	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	35
B-HH5	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAGCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	37
B-HH6	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATCAATTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGG</u> <u>CTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>GCGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>ACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCC</u> <u>AGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	39
B-HH7	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATCTCGTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGG</u> <u>CTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>GCGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>ACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCC</u> <u>AGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	41
B-HH8	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCGGGATACGCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCCA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAAATCCAAGG</u> <u>CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAAATCCAAGG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	43

B-HH9	<u>CAGGTGCAATTGGTGCACTTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGG</u> <u>ATGAAGTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCGA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGG</u> <u>CAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	45
B-HL1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCACTTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG</u> <u>ATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGG</u> <u>CTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCGAT</u> <u>GGGGATACTGACTACGCACAGAAATCCAAGGA</u> <u>AGAGTCACAATGACACGGGACACGTCCACTTCC</u> <u>ACCGTCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT</u> <u>GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCC</u> <u>AGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	47
B-HL2	<u>GAGGTGCAATTGGTGCACTTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGC</u> <u>AAGGTGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG</u> <u>ATGCACTGGGTGCAAGCAGGCCCTGGAAAGGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCGA</u> <u>TGGGGATACTGACTACGCAGAGAAATCCAAGG</u> <u>AAGAGTCACAATCACAGCCGACACGTCCACTGA</u> <u>CACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAA</u> <u>TGCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	49
B-HL3	<u>GAGGTGCAATTGGTGCACTTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGC</u> <u>AAGGTGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG</u> <u>ATGAAGTGGGTGCAAGCAGGCCCTGGAAAGGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCGA</u> <u>TGGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGG</u> <u>AAGAGTCACAATCACAGCCGACACGTCCACTGA</u> <u>CACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAA</u> <u>TGCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	51
B-HL4	<u>CAGATGCAATTGGTGCACTTGGCGCTGAAGTT</u> <u>AAGAAGACCGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGC</u> <u>AAGGCTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGG</u> <u>ATGAGCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGG</u> <u>GCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGCGA</u> <u>TGGGGATACTGACTACGCACAGAAATCCAAGG</u> <u>AAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAG</u> <u>CACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGC</u> <u>CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC</u> <u>ACC</u>	53
B-HL8	<u>GAAGTGCACTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTG</u> <u>GTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGT</u> <u>GCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGA</u> <u>TGAAGTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCC</u> <u>TCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGGCGATG</u> <u>GGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGCA</u> <u>GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCA</u> <u>CAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG</u> <u>AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATG</u> <u>TCITTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCCA</u> <u>GGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	55
B-HL10	<u>CGGAATTCGCCCCACCGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGG</u> <u>AGTCTGGAGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCG</u> <u>ATTGAGTATTCTTGGATGAAGTGGGTGCGGCA</u> <u>GGCTCCTGGAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG</u> <u>GATCTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	57
B-HL11	<u>CAGGTGCACTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTG</u> <u>GTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGT</u> <u>GCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGA</u> <u>TGAAGTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCC</u> <u>TCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGGCGATG</u> <u>GGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGCA</u> <u>GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCA</u> <u>CAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG</u> <u>AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATG</u> <u>TCITTTGATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCCA</u> <u>GGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA</u>	59

B-HL12	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGG</u> <u>AGTCTGGAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTAC</u> <u>ATTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCA</u> <u>GGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG</u> <u>GATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	61
B-HL13	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTCG</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTGGTCAAGCCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTAC</u> <u>ATTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCA</u> <u>GGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG</u> <u>GATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	63
B-HL14	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTCG</u> <u>AGTCCGGAGGAGGCTGAAGAAGCCTGGCGGG</u> <u>TCCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCA</u> <u>CATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGC</u> <u>AGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGACTACA</u> <u>ATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCG</u> <u>CCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGC</u> <u>TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTG</u> <u>GCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	65
B-HL15	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGG</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTAC</u> <u>ATTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCA</u> <u>GGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG</u> <u>GATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	67
B-HL16	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGG</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGGTCAGCTGCGCAGCCTCTGGATTCA</u> <u>CATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGC</u> <u>AGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGACTACA</u> <u>ATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCG</u> <u>CCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGC</u> <u>TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTG</u> <u>GCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	69
B-HL17	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACT</u> <u>GGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG</u> <u>CCACAGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGG</u> <u>AGTCTGGAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTAC</u> <u>ATTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCA</u> <u>GGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG</u> <u>GATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCT</u> <u>GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGG</u> <u>CTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC</u> <u>GTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	71
Сигнальная последовательность VN	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGT</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCC</u>	73

B-KV1	<u>GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTG</u> <u>CCCGTCACCCCTGGAGAGCCCGCCAGCATTAGC</u> <u>TGCAGGTCTAGCAAGAGCCTCTTGACAGCAAT</u> <u>GGCATCACTTATTTGTATTGGTACCTGCAAAAG</u> <u>CCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATTATCAA</u> <u>ATGTCCAACCTTGTCTCTGGCGTCCCTGACCGGT</u> <u>TCTCCGGATCCGGGTCAAGCACTGATTTCACAC</u> <u>TGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG</u> <u>GAGTTTATTACTGCGCTCAGAATCTAGAACTTC</u> <u>CTTACACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA</u> <u>TCAAACGTACGGTG</u>	75
Сигнальная последова- тельность VL	<u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGC</u> <u>CTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAAGGTGCCAGGTGT</u>	77

Таблица 3

Конструкция	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
B-HH1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSYSWMS</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDIAQKFQGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLV</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>	<u>30</u>
B-HH2	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLV</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>	<u>32</u>
B-HH3	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYLCARNVFDGYWLV</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>	<u>34</u>
B-HH4	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYAFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>36</u>
B-HH5	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWMS</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>38</u>
B-HH6	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINW</u> <u>VRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVY</u> <u>WGQGLTVTVSS</u>	<u>40</u>
B-HH7	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWISW</u> <u>VRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVY</u> <u>WGQGLTVTVSS</u>	<u>42</u>
B-HH8	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>44</u>

B-HH9	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>46</u>
B-HL1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMH</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDAQKFQGRVT</u> <u>MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY</u> <u>WLVIWGQGLTVTVSS</u>	<u>48</u>
B-HL2	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMH</u> <u>WVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYDAEKQGRVTI</u> <u>TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>50</u>
B-HL3	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMN</u> <u>WVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>52</u>
B-HL4	<u>QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYSWMS</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDAQKFQGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>	<u>54</u>
B-HL8	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>56</u>
B-HL10	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNW</u> <u>VRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVI</u> <u>WGQGLTVTVSS</u>	<u>58</u>
B-HL11	<u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>60</u>
B-HL12	<u>EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>62</u>
B-HL13	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNW</u> <u>VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVI</u> <u>WGQGLTVTVSS</u>	<u>64</u>
B-HL14	<u>EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNW</u> <u>VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVI</u> <u>WGQGLTVTVSS</u>	<u>66</u>
B-HL15	<u>EVQLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGFTFSYSWMNW</u> <u>VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTIT</u> <u>ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL</u> <u>VYWGQGLTVTVSS</u>	<u>68</u>
B-HL16	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMNW</u> <u>VRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITA</u> <u>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVI</u> <u>WGQGLTVTVSS</u>	<u>70</u>
B-HL17	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTI</u> <u>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW</u> <u>LVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>72</u>
Сигнальная последова- тельность VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	<u>74</u>
B-KV1	<u>DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSKSLHSNGITYLY</u> <u>WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDF</u> <u>TLKISRVEAEDVGVYYCAQNELEPYFGGGTKVEIKR</u> <u>TV</u>	<u>76</u>
Сигнальная последова- тельность VL	<u>MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC</u>	<u>78</u>

Выделенный полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирует полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 1 или 2. Выделенная нуклеиновая кислота может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 5 или фиг. 6. Она также может содержать последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 5 или фиг. 6. Также выделенная нуклеиновая кислота может содержать последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого представлена на одной из фиг. 1, 2, 5 или 6 с консервативными аминокислотными заменами.

Экспрессионный вектор и/или клетка-хозяин могут содержать один или несколько указанных выделенных полинуклеотидов. Как правило, любую культивируемую клеточную линию можно применять

для экспрессии антител, предлагаемых в настоящем изобретении. CHO-клетки, ВНК-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышинной миеломы линии Р3Х63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или растительные клетки используют в качестве основной клеточной линии для создания клеток-хозяев продуцентов антител.

Терапевтическую эффективность антител можно усиливать, получая их в клетке-хозяине, которая дополнительно экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид, который обладает GnTIII-активностью. Полипептид, обладающий GnTIII-активностью, может представлять собой слитый полипептид, который содержит домен локализации в комплексе Гольджи присущего комплексу Гольджи полипептида. Экспрессия антител, в клетке-хозяине, которая экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид, который обладает GnTIII-активностью, приводит к получению антител, которые обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией. Таким образом, клетка-хозяин может содержать (а) выделенную нуклеиновую кислоту, которая содержит последовательность, кодирующую полипептид, который обладает GnTIII-активностью; и (б) выделенный полинуклеотид, который кодирует гуманизированное антитело, которое связывается с человеческим CD20. Полипептид, обладающий GnTIII-активностью, может быть слитым полипептидом, который содержит каталитический домен GnTIII, а домен локализации в комплексе Гольджи представлять собой домен локализации маннозидазы II. Методы получения таких слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны в предварительной заявке на патент США № 60/495142, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Антитело или его фрагмент обладают способностью к специфическому связыванию, свойственную мышинному антителу B-LY1, оно содержит человеческую Fc-область и является гуманизированным.

Один или несколько полинуклеотидов, кодирующих антитело, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или в другом варианте регулируемой экспрессионной системы. Приемлемые регулируемые экспрессионные системы включают (но, не ограничиваясь ими) регулируемую тетрациклином экспрессионную систему, индуцируемую экдизоном экспрессионную систему, переключаемую с помощью Iac экспрессионную систему, индуцируемую глюкокортикоидом экспрессионную систему, систему с использованием индуцируемого температурой промотора и индуцируемую металлом металлотионеина экспрессионную систему. Если в систему клетки-хозяина входят несколько различных нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, то некоторые из них можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора, а другие экспрессировать под контролем регулируемого промотора. За максимальный уровень экспрессии принимают наиболее высокий возможный уровень стабильной экспрессии полипептида, который не оказывает значительного вредного воздействия на скорость клеточного роста, и его можно определять с помощью обычного эксперимента. Уровни экспрессии определяют методами, хорошо известными в данной области, в том числе с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антитела, специфического в отношении целевого антитела, или антитела, специфического к пептидной метке, слитой с ним; и методом Нозерн-блоттинга. В другом варианте полинуклеотид может быть функционально связан с репортерным геном; уровни экспрессии химерного антитела, которое имеет аффинность связывания, практически такую же, как у мышинного антитела B-Ly1, определяют, оценивая сигнал, который коррелирует с уровнем экспрессии репортерного гена. Репортерный ген можно транскрибировать вместе с нуклеиновой(ами) кислотой(ами), которая(ые) кодирует(ют) слитый полипептид, в виде одной молекулы мРНК; соответствующие им кодирующие последовательности могут быть слиты либо с помощью внутреннего сайта входа в рибосому (IRES) или с помощью независимого от кэпа энхансера трансляции (CITE). Репортерный ген можно транслировать в сочетании с по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой, кодирующей химерное антитело которое имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышинного антитела B-Ly1, с образованием одной полипептидной цепи. Нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитела можно функционально связывать с репортерным геном под контролем одного промотора, так, чтобы нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид и репортерный ген, транскрибировалась с молекулы РНК, из которой в результате альтернативного сплайсинга образовывались две различные молекулы матричной РНК (мРНК); после трансляции одной из образовавшихся мРНК получают репортерный белок, а после трансляции второй получают указанный слитый полипептид.

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

Для экспрессии кодирующей последовательности антител можно использовать, различные системы экспрессионных векторов-хозяев. Предпочтительно клетки млекопитающих применяют в качестве сис-

тем клеток-хозяев, трансфектированных экспрессионными векторами в виде рекомбинантной плазмидной ДНК или рекомбинантной космидной ДНК, которые содержат кодирующую последовательность представляющего интерес белка и кодирующую последовательность слитого полипептида. Наиболее предпочтительно в качестве системы клетки-хозяина применяют CHO-клетки, ВНК-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышинной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых и растительные клетки. Некоторые примеры экспрессионных систем и методов отбора даны в следующих публикациях и приведенных в них ссылках: Borth и др., *Biotechnol. Bioen.* 71(4), 2000-2001, сс. 266-273, Werner и др., *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8), 1998, сс. 870-880, Andersen и Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13, 2002, сс. 117-123, Chadd и Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 2001, сс. 188-194 и Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 2001, сс. 450-454. Однако можно применять другие системы на основе эукариотических клеток-хозяев, такие как клетки дрожжей, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, которые содержат последовательность, кодирующую антитела; системы клеток насекомых, зараженных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например бакуловирусами), содержащими кодирующую последовательность химерного антитела, которое имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышинного антитела B-Ly1; системы растительных клеток, зараженные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV), или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например Ti-плазмидными), которые содержат кодирующую последовательность антител; или системы на основе клеток животных, зараженных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например аденовирусными, на основе вируса оспы), включая клеточные линии, сконструированные так, что они содержат множество копий ДНК, кодирующей химерное антитело, которое имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышинного антитела B-Ly1, где копии либо стабильно амплифицируются (CHO/dhfr), либо нестабильно амплифицируются в двойных микрохромосомах (например мышинные клеточные линии). Вектор, содержащий полинуклеотид(ы), который(ые) кодирует(ют) антитела может быть полицистронным. В способах понятие "стабильная экспрессия", как правило, предпочтительно относится к кратковременной экспрессии, поскольку при этом обычно получают более воспроизводимые результаты, а также это больше соответствует крупномасштабному производству. Помимо применения экспрессионных векторов, которые содержат вирусные сайты инициации репликации, клетки-хозяева можно трансформировать соответствующими кодирующими нуклеиновыми кислотами, которые находятся под контролем соответствующих контролирующих экспрессию элементов (например, промоторные, энхансерные последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т.д.), и селективируемым маркером. После интродукции чужеродной ДНК созданным клеткам можно давать расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах, а затем переносить на селективные среды. Селективируемый маркер в рекомбинантных плаزمиде придает устойчивость к селективирующему агенту и позволяет отбирать клетки, в хромосомах которых присутствует стабильно интегрированная плазида, и выращивать до образования очагов, которые в свою очередь можно клонировать и размножать с получением клеточных линий.

Можно применять многочисленные системы селекции, включая (но, не ограничиваясь ими) гены тимидинкиназы герпеса простого (Wigler и др., *Cell* 11, 1977, с. 223), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska и Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 1962, с. 2026), и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy и др., *Cell* 22 1980, с. 817), которые можно применять в t^+ -, hg Протеин⁻ или aПротеин⁻ клетках соответственно. Кроме того, можно использовать устойчивость к антиметаболитам в качестве основы для отбора гена dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler и др., *Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1989, с. 3567; O'Hare и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1981, с. 1527); гена gpt, который придает устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan и Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1981, с. 2072); гена neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Colberte-Garapin и др., *J. Mol. Biol.* 150, 1981, с. 1; и гена hyg, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre и др., *Gene* 30, 1984, с. 147). В настоящее время описаны дополнительные селективируемые гены, такие как trpB, который обуславливает возможность клеток утилизировать индол вместо триптофана; hisD, который обуславливает возможность клеток утилизировать гистинол вместо гистидина (Hartman и Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1988, с. 8047); система глутаминсинтазы; и ODC (орнитиндекарбоксилаза), который придает устойчивость к ингибитору орнитиндекарбоксилазы, 2-(дифторметил)-DL-орнитину, DFMO (McConlogue, в: *Current Communications in Molecular Biology*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory (1987)).

Способ модификации профиля гликозилирования антител, которые продуцируются клеткой-хозяином, заключается в том, что экспрессируют в клетке-хозяине нуклеиновую кислоту, кодирующую эти антитела, и нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который обладает GnTIII-активностью, или вектор, содержащий указанные нуклеиновые кислоты. Предпочтительно модифицированный полипептид представляет собой IgG или его фрагмент, содержащий Fc-область. Модифицированные антитела, продуцируемые клетками-хозяевами, в результате модификации обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и/или повышенной эффекторной функцией. Предпочтительно по-

вышенная аффинность к связыванию с Fc-рецептором представляет собой повышенное связывание с активирующим Fc γ -рецептором, таким как Fc γ RIIIa-рецептор. Повышенная эффекторная функция предпочтительно представляет собой повышение одной или нескольких следующих функций: повышенная антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, повышенный антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), повышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с полиморфноядерными клетками (PMN), повышенное связывание с моноцитами, повышенное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное созревание дендритных клеток и повышенное Т-клеточное примирование.

Способ получения антител, которые имеют модифицированные олигосахариды в клетке-хозяине, заключается в том, что (а) культивируют клетку-хозяина, сконструированную для экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который обладает GnTIII-активностью, в условиях, которые позволяют осуществлять производство этих антител, где полипептид, обладающий GnTIII-активностью, экспрессируют в количестве, достаточном для модификации олигосахаридов в Fc-области антител, продуцируемых клеткой-хозяином; и (б) выделяют указанные антитела. Полипептид, обладающий GnTIII-активностью, может представлять собой слитый полипептид, который несет каталитический домен GnTIII. Этот слитый полипептид может содержать дополнительно домен локализации в комплексе Гольджи присущего комплексу Гольджи полипептида.

Предпочтительно домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II или GnTI. В альтернативном варианте домен локализации в комплексе Гольджи выбирают из группы, включающей: домен локализации маннозидазы I, домен локализации GnTII и домен локализации α -1-6 коровой фукозилтрансферазы. Описанные в заявке антитела обладают повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и/или повышенной эффекторной функцией. Предпочтительно повышенная эффекторная функция представляет собой одну или несколько следующих функций: повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (включая повышенную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность), повышенный антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), повышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с моноцитами, повышенное связывание с полиморфноядерными клетками, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное перекрестное связывание связывающихся с мишенью антител, повышенное созревание дендритных клеток или повышенное Т-клеточное примирование. Повышенная аффинность к связыванию с Fc-рецептором предпочтительно представляет собой повышенное связывание с активирующими Fc γ -рецепторами, таким как Fc γ RIIIa-рецептор. У предложенных антител специфичность связывания практически такая же, как у мышинового антитела B-Ly1, и повышенное содержание бисекционных олигосахаридов в Fc-области указанного полипептида. Процент бисекционных олигосахаридов в Fc-области антитела может составлять 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. Антитело может иметь повышенное содержание нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области в результате модификации олигосахаридов. Процент нефукозилированных олигосахаридов может составлять по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%-70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 75%. Нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа. Антитело, полученное в клетках-хозяевах, может обладать повышенным содержанием бисекционных нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области. Бисекционные нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридными или комплексными. В частности антитела могут иметь по меньшей мере 15%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 35% олигосахаридов Fc-области антитела могут быть бисекционными нефукозилированными. Могут быть получены полипептиды, в которых по меньшей мере 15%, предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 35% олигосахаридов в Fc-области полипептида являются бисекционными гибридными нефукозилированными.

Химерное антитело может обладать специфичностью связывания, практически такой же, как у мышинового антитела B-Ly1, так что оно обладает повышенной эффекторной функцией и/или повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором. Предпочтительно повышенная эффекторная функция представляет собой одну или несколько следующих функций: повышенная Fc-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (включая повышенную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность), повышенный антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), по-

вышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с моноцитами, повышенное связывание с полиморфноядерными клетками, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное перекрестное связывание связывающихся с мишенью антител, повышенное созревание дендритных клеток или повышенное Т-клеточное примирование. В частности повышенная аффинность к связыванию с Fc-рецептором может означать повышенное связывание с активирующим Fc-рецептором, наиболее предпочтительно FcγRIIIa.

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

Получение клеточных линий для производства белков с измененной схемой гликозилирования

Системы экспрессии клеток-хозяев можно создавать так, чтобы они содержали рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, обладающий GnTIII-активностью, функционально связанную с конститутивной или регулируемой промоторной системой.

Клетку-хозяина можно конструировать для экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, который обладает GnTIII-активностью, и который содержит домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида. Клетка-хозяин может также нести молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один ген, который кодирует слитый полипептид, обладающий GnTIII-активностью, и содержащую домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида.

Как правило, любой тип культивируемой клеточной линии, включая перечисленные выше клеточные линии, можно применять в качестве основы для создания линий клеток-хозяев. Это CHO-клетки, BHK-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышинной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, другие клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых или растительные клетки используют в качестве основной клеточной линии для создания клеток-хозяев.

Одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, который обладает GnTIII-активностью, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или в другом варианте регулируемой экспрессионной системы. Такие системы хорошо известны в данной области, и они включают описанные выше системы. Если несколько различных нуклеиновых кислот, кодирующих слитые полипептиды, которые обладают GnTIII-активностью и содержат домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного присущего комплексу Гольджи полипептида, входят в систему клетки-хозяина, то некоторые из них можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора, а другие экспрессировать под контролем регулируемого промотора. Уровни экспрессии слитых полипептидов, которые обладают GnTIII-активностью, определяют методами, хорошо известными в данной области, включая анализ методом Вестерн-блоттинга, методом Нозерн-блоттинга, анализ экспрессии репортерного гена или определение GnTIII-активности. В альтернативном варианте можно применять лектин, который связывается с продуктами биосинтеза GnTIII, например E4-РНА-лектин. В альтернативном варианте можно использовать функциональный анализ, который позволяет оценивать повышенную способность связываться с Fc-рецептором или повышенную эффекторную функцию, опосредуемую антителами, которые получают путем создания клеток, несущих нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, обладающий GnTIII-активностью.

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

Клетки-хозяева, которые содержат кодирующую последовательность антитела, которое имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышинного антитела B-Ly1, и экспрессирует биологически активные генные продукты, можно модифицировать с помощью по меньшей мере четырех общих подходов, таких как: (а) гибридизация ДНК-ДНК или ДНК-РНК; (б) наличие или отсутствие функций "маркерных" генов; (в) оценка уровня транскрипции в качестве меры экспрессии соответствующих транскриптов мРНК в клетке-хозяине; и (г) обнаружение генных продуктов с помощью иммунного анализа или по их биологической активности.

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

При использовании второго подхода рекомбинантный экспрессионный вектор/систему хозяина

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

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

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

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

Ранее описано создание определенной схемы гликозилирования антител (см., например, U.S. 6602684, содержание которого полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки).

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

Другой дополняющий подход к повышению ADCC-активности неконъюгированных IgG1 состоит в конструировании Fc-области антитела. Опыты по конструированию белков позволили установить, что FcγR взаимодействуют с меньшей шарнирной областью CH2-домена IgG (Lund и др., *J. Immunol.* 157, 1996, сс. 4963-4969). Однако для связывания FcγR также требуется присутствие олигосахаридов, ковалентно связанных с консервативным Asn 297 в CH2-области (Lund и др., *J. Immunol.* 157, 1996, сс. 4963-4969; Wright и Morrison, *Trends Biotech.* 15, 1997, сс. 26-31), это позволяет предположить либо, что олигосахарид и полипептид оба непосредственно принимают участие в сайте связывания, либо что для поддержания активной конформации CH2-полипептида требуется олигосахарид. Таким образом, модификацию структуры олигосахарида можно применять в качестве средства повышения аффинности взаимодействия.

Молекула IgG несет два N-связанных олигосахарида в Fc-области, по одному на каждой тяжелой цепи. Как любой гликопротеин антитело получают в виде популяция гликоформ, которые имеют одинаковый полипептидный каркас, но несут различные присоединенные к сайтам гликозилирования олигосахариды. Олигосахариды, которые, как правило, присутствуют в Fc-области сывороточного IgG, представляют собой комплекс олигосахаридов биантенного типа (Wormald и др., *Biochemistry* 36, 1997, сс.

130-138) с низким уровнем концевой сиаловой кислоты и бисекционного N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), с различными уровнями концевого галктозилирования и корового фукозилирования. В некоторых исследованиях высказано предположение, что для FcγR-связывания внутри олигосахаридного ядра требуется минимальная углеводная структура (Lund и др., *J. Immunol.* 157, 1996, сс.4963-4969).

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

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

В проведенных ранее экспериментах использовали одну антителопродуцирующую линию CHO-клеток, которая ранее была создана для экспрессии под воздействием внешней регуляции различных уровней клонированного гена фермента GnTIII (Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180). Этот подход, прежде всего, использовали для доказательства строгой корреляции между экспрессией GnTIII и ADCC-активностью модифицированного антитела. Повышенная GnTIII-активность приводит к повышению процентного содержания бисекционных олигосахаридов, а также к снижению процентного содержания фукозных остатков в Fc-области антитела. Это антитело обладает повышенной аффинностью к связыванию с Fc-рецептором и повышенной эффекторной функцией.

Терапевтическое применение антител

Описанные в заявке антитела можно применять индивидуально для мечения и уничтожения опухолевых клеток *in vivo*. Их можно использовать также в сочетании с соответствующим терапевтическим агентом для лечения карциномы человека. Например, эти антитела можно применять в сочетании со стандартными или общепринятыми методами лечения, такими как химиотерапии, лучевая терапия, или их можно конъюгировать или связывать с терапевтическим лекарственным средством или токсином, а также с лимфокином или ингибирующим рост опухоли фактором для введения терапевтического агента в область карциномы. Наиболее важными конъюгатами антител являются (1) иммунотоксины (конъюгаты антитела и цитотоксического фрагмента) и (2) меченые (например меченные с помощью радиоактивного изотопа, меченные с помощью фермента или меченные с помощью флуорохрома) антитела, в которых метка является средством идентификации иммунных комплексов, включающих меченные антитела. Антитела можно применять также для индукции лизиса посредством встречающегося в естественных условиях связанного с компонентом процесса и для взаимодействия с существующей в норме антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью.

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

Химерное антитело с сконструированной схемой гликозилирования, которое имеет специфичность связывания, практически такую же, как у мышинного антитела B-Ly1, можно конъюгировать с А-цепью

рицина. А-цепь рицина можно дегликозилировать и получить с помощью рекомбинции. Предпочтительный метод получения иммунооксина рицина описан у Vitetta и др., *Science* 238, 1987, с. 1098), публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки.

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

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

Кроме того, в липосомы можно вносить цитотоксическое лекарственное средство и на липосомы можно наносить антитела. Поскольку на поверхности злокачественных В-клеток присутствует множество молекул CD20, этот метод позволяет осуществлять введение больших количеств лекарственного средства к клеткам требуемого (правильного) типа.

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

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

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

Одноцепочечный иммунотоксин, содержащий антигенсвязывающие центры, которые обладают практически такой же специфичностью связывания, что и мышиное антитело B-Ly1 (например, полипептиды, которые содержат CDR мышинового антитела B-Ly1), и токсичный полипептид можно применять для лечения человеческой саркомы *in vivo*.

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

Способ избирательного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD20 предусматривает взаимодействие иммуноконъюгата (например иммунотоксина) с указанными опухолевыми клетками. Эти опухолевые клетки могут представлять собой клетки человеческой карциномы.

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

Способ лечения В-клеточных пролиферативных нарушений, включая В-клеточную лимфому, а также аутоиммунного заболевания, частично или полностью вызванного патогенными аутоантителами, основой которого является В-клеточное "истощение", заключается в том, что человеку, который нуждается в этом, вводят терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела к CD20 со сконструированной схемой гликозилирования, которое обладает практически такой же специфичностью связывания, что и мышиное антитело B-Ly1. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают (но, не ограничиваясь ими) иммунные тромбоцитопении, такие как острая идиопатическая

тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, дерматомиозит, хорею Сиденгама, волчанковый нефрит, ревматическую атаку, плеригландулярные синдромы, геморрагический васкулит (болезнь Шенлейна-Геноха), нефрит после стрептококковой инфекции, узловую эритему, артерит Такаясу, болезнь Аддисона, многоформную эритему, узловатый полиартерит, анкилозирующий спондилит, синдром Гудпасчера, тромбангит облитерирующий, первичный билиарный цирроз, тиреоидит Хашимото, тиротоксикоз, хронический активный гепатит, полимиозит/дерматомиозит, полихондрит, панфигит обыкновенный (*rampyphigus vulgaris*), гранулематоз Вегенера, мембранную нефропатию, боковой амиотрофический склероз, сухотку спинного мозга, полимиалгии, пернициозную анемию, быстро прогрессирующий гломерулонефрит и фиброзный альвеолит, воспалительные реакции, такие как воспалительные кожные заболевания, включая псориаз и дерматит (например атопический дерматит); системную склеродермию и склероз; реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такие как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; РДСВ); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, связанные с Т-клеточной инфильтрацией и хроническими воспалительными реакциями; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (СКВ); сахарный диабет (например сахарный диабет типа I или инсулинзависимый сахарный диабет); рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; юношеский диабет; и иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, что обычно наблюдается при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); болезни, включающие диapedез лимфоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром поражения множества органов; гемолитическую анемию (включая (но, не ограничиваясь ими) криоглобинемия или анемию Куумба (*Coombs positive anemia*); тяжелую псевдопаралитическую хромоту; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антител; заболевание, повреждающее клубочковую базальную мембрану; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Лэмберта-Итона; буллезный пемфигоид; пузырьчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром негнущегося человека; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунный комплексный нефрит; IgA-нефропатию; IgM-полинейропатию; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению и т.д. Описанные в заявке антитела можно также применять для "истощения" находящихся в кровотоке здоровых В-клеток в течение пролонгированного периода времени.

Пациенты, которых можно лечить, представляют собой человека, лошадь, свинью, быка, мышь, собаку, кошку и птиц и других теплокровных животных.

Способы ингибирования роста человеческих опухолевых клеток, лечения опухоли у пациента и лечение заболевания пролиферативного типа у пациента заключаются в том, что пациенту вводят эффективное количество описанной в заявке композиции.

Фармацевтические композиции могут быть предназначены для применения при лечении человеческих карцином, которые содержат фармацевтически эффективное количество антитела, и фармацевтически приемлемый носитель.

Их можно вводить общепринятыми путями, включая (но, не ограничиваясь ими) внутривенное, внутрибрюшинное, оральное, внутрилимфатическое введение или введение непосредственно в опухоль, предпочтительным является внутривенное введение.

Терапевтические композиции готовят в предназначенной для хранения форме путем смешения антитела, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16-ое изд., под ред. Osol A., 1980), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и представляют собой буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид, гексаметонийхлорид, бензалконийхлорид, бензетонийхлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и мета-крезол); низкомолекулярные (состоящие менее чем примерно из 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры композиций в виде антител к CD20 описаны в WO 98/56418, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки. В этой публикации описана жидкая композиция, включающая несколько доз, которая содержит 40 мг/мл

ритуксимаба, 25 мМ ацетат, 150 мМ трегалозу, 0,9% бензилового спирта, 0,02% полисорбата 20, pH 5,0, минимальный срок годности которой составляет 2 года при хранении при 2-8°C. Другая содержащая антитело к CD20 представляющая интерес композиция содержит 10 мг/мл ритуксимаба в смеси, включающей 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильную воду для инъекций, pH 6,5.

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

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

Действующие вещества могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или с помощью межфазной полимеризации, например, в микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидных системах для введения лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы), или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-ое изд., под ред. OsolA., 1980.

Можно готовить препараты с замедленным высвобождением. Соответствующими примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антагонист, эти матрицы могут представлять собой изделия, имеющие определенную форму, например, пленок или микрокапсул. Примерами матриц в препаратах с пролонгированным высвобождением являются сложные полиэфиры, гидрогели (например поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт), полилактиды (U.S. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразложимые сополимеры этилена и винилацетата, разложимые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъеклируемые микрокапсулы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и леупролида-ацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

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

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

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

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

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

Такие композиции можно готовить, дозировать и вводить путями, соответствующими высокоэффективной медицинской практике. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное заболевание или нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, течение болезни или нарушения, область введения агента, метод введения, схему применения и другие факторы, известные практикующим специалистам-медикам. Терапевтически эффективное количество антагониста, подлежащее введению, должно определяться этими факторами.

В соответствии с общепринятыми положениями терапевтически эффективное количество антитела на дозу при парентеральном введении должно составлять примерно 0,1-20 мг/кг веса тела пациента в день, при этом обычные начальные дозы применяемого антагониста составляют примерно 2-10 мг/кг. Приемлемые дозы такого неконъюгированного антитела составляют, например, от примерно 20 до примерно 1000 мг/м². Доза антитела может отличаться от дозы, рекомендованной в настоящее время для RITUXAN®. Например, пациенту можно вводить одну или несколько доз антитела, которые существенно ниже 375 мг/м², например, доза может составлять от примерно 20 до примерно 250 мг/м², например, от примерно 50 до примерно 200 мг/м².

Кроме того, антитело можно вводить в виде одной или нескольких начальных доз с последующим введением еще одной или нескольких доз антитела, при этом дозы антитела (в мг/м²) в последующих дозах превышают начальную(ые) дозу(ы) антитела (в мг/м²). Например, начальная доза может составлять от примерно 20 до примерно 250 мг/м² (например от примерно 50 до примерно 200 мг/м²), а последующие дозы могут составлять от примерно 250 до примерно 1000 мг/м².

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

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

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

Очевидно, что дозу композиции, которая необходима для достижения лечебного действия, можно дополнительно снижать путем оптимизации схемы приема лекарственного средства.

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

Детергент, может представлять собой неионный детергент. Примеры неионных детергентов включают (но, не ограничиваясь ими) полисорбат 80 (известный также под названием Твин 80 или полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат), Brij и Тритон (например, Тритон WR-1339 и Тритон А-20).

В другом варианте детергент может представлять собой ионный детергент. Примеры ионных детергентов включают (но, не ограничиваясь им) алкилтриметиламмонийбромид.

Кроме того, липидный носитель может представлять собой липосому. В контексте настоящего описания понятие "липосома" обозначает любой связанный с мембраной пузырек, который содержит любые антитела или их комбинации.

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

Примеры

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

Пример 1.

Материалы и методы.

Клонирование и экспрессия рекомбинантного антитела B-Ly1.

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

Для конструирования экспрессионных векторов для химерного B-Ly1 синтетические сигнальные последовательности и соответствующие сайты рестрикции сливали с переменными областями цепей с помощью дополнительных ПЦР. После окончательного подтверждения правильности последовательности ДНК переменных областей цепей их объединяли с соответствующими константными областями человеческого IgG1. После создания генов их клонировали под контролем промотора MPSV и против хода транскрипции относительно синтетического сайта полиаденилирования (polyA) с использованием двух отдельных векторов, по одному для каждой цепи, в результате чего получали плазмиду pETR1808 (экспрессионный вектор для тяжелой цепи) и pETR1813 (экспрессионный вектор для легкой цепи). Каждый вектор нес последовательность OriP EBV.

Химерное B-Ly1 конструировали путем котрансфекции клеток линии HEK293-EBNA векторами pETR1808 и pETR1813 с помощью метода трансфекции, основанного на использовании фосфата кальция. Клетки линии HEK293-EBNA на экспоненциальной фазе роста трансфектировали с помощью метода трансфекции, основанного на использовании фосфата кальция. Клетки выращивали в виде адгезионных монослойных культур в Т-колбах с использованием среды для культивирования DMEM, дополненной 10% FCS, и осуществляли трансфекцию, когда они достигали 50-80%-ной конfluence. Для трансфекции Т75-колбы 8 миллионов клеток высевали за 24 ч до трансфекции в 14 мл среды для культивирования DMEM, дополненной FCS (в конечной концентрации 10 об.%), 250 мкг/мл неомицина, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для каждой используемой для трансфекции Т75-колбы приготавливали раствор, содержащий ДНК, CaCl₂ и воду, путем смешения 47 мкг общей плазмидной векторной ДНК, взятой в виде равных долей экспрессионных векторов для легкой и тяжелой цепей, 235 мкг 1М раствора CaCl₂ и добавления воды до конечного объема 469 мкл. К этому раствору добавляли 469 мкл 50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ раствор Na₂HPO₄, pH 7,05, сразу перемешивали в течение 10 с и давали выстояться при комнатной температуре в течение 20 с. Суспензию разбавляли 12 мл DMEM, дополненной 2% FCS, и вносили в колбу Т75 вместо существующей среды. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение примерно 17-20 ч, затем среду заменяли 12 мл DMEM, 10% FCS. Для продуцирования немодифицированного антитела "chB-Ly1" клетки трансфектировали только экспрессионными векторами для антитела pETR1808 и pETR1813, взятыми в соотношении 1:1. Для продуцирования антитела "chB-Ly1-ge", имеющего сконструированную схему гликозилирования, клетки котрансфектировали четырьмя плазмидами, двумя для экспрессии антитела (pETR1808 и pETR1813), одной для экспрессии слитого полипептида GnTIII (pETR1519) и одной для экспрессии маннозидазы II (pCLF9), взятыми в соотношении 4:4:1:1, соответственно. В день 5 после трансфекции супернатант собирали, центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин, а затем второй раз центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин и выдерживали при 4°C.

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

Анализ олигосахаридов.

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

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

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

Лунки 96-луночного планшета из ПВДФ-мембраны (типа Immobilon P, фирма Millipore, Бэдфорд, шт. Массачусетс) смачивали 100 мкл метанола и жидкость отсасывали через ПВДФ-мембрану с помо-

шью вакуума, создаваемого в вакуумном многомембранном коллекторе (типа Millipore, Бэдфорд, шт. Массачусетс). ПВДФ-мембраны трижды промывали 300 мкл воды. Затем лунки промывали 50 мкл RCM-буфера (8М мочевины, 360 мМ Трис, 3,2М ЭДТК, pH 8,6). 30-40 мкг антитела вносили в лунку, содержащую 10 мкл RCM-буфера. Жидкость в лунке отсасывали через мембрану путем создания вакуума и мембрану последовательно дважды промывали 50 мкл RCM-буфера. Восстановление дисульфидных мостиков осуществляли путем добавления 50 мкл 0,1М дитиотреитола в RCM и инкубации при 37°C в течение 1 ч.

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

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

N-связанные олигосахариды высвобождали путем добавления 2,5 мед пептид-N-гликозидазы F (рекомбинантная N-гликаназа, фирма GLYKO, Новато, шт. Калифорния) и 0,1 мед сиалидазы (фирма GLYKO, Новато, шт. Калифорния) для удаления любых возможных заряженных остатков моносахаридов в конечном объеме 25 мкл в 20мМ NaHCO₃, pH 7,0). Расщепление осуществляли в течение 3 ч при 37°C.

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

Использование расщепления с помощью эндоглюкозидазы N высвобожденных с помощью PNGазыF олигосахаридов для определения соответствия структур гибридных бисекционных олигосахаридов пикам нейтральных олигосахаридов, полученных методом MALDI/TOF-MC.

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

Приготовление образца для MALDI/TOF-MC.

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

MALDI/TOF-MC.

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

В-клеточное истощение цельной крови.

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

Связывание антител к CD20 с клетками линии Raji.

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

Пример 2.

Подход с использованием акцептора с высокой степенью гомологии.

Поиск каркасного участка антитела-акцептора с высокой степенью гомологии проводили на основе сравнительного анализа белковой последовательности мышиногo B-ly1 и коллекцией последовательностей человеческой зародышевой линии и отбора той человеческой последовательности, которая обладала наибольшей степенью идентичности последовательности. В результате этого последовательности VH1_10 из базы данных VBase была выбрана в качестве акцепторной каркасной последовательности тяжелой цепи, а последовательность VK_2_40 была выбрана в качестве акцепторной каркасной последовательности легкой цепи. В эти два акцепторных каркаса трансплантировали (встраивали) три гипервариабельных участка (CDR) вариабельных областей мышиногo тяжелой и легкой цепи. Поскольку каркасный участок 4 не являлся частью гена вариабельной области V зародышевой линии, сравнительный анализ для этого положения проводили индивидуально. Для тяжелой цепи выбирали участок JH4, а для легкой цепи выбирали участок JK4. Молекулярное моделирование сконструированного домена иммуноглобулина позволило выявить одно положение за пределами CDR, в котором потенциально возможно заменять человеческие аминокислотные остатки на мышинные. Повторная интродукция мышинных аминокислотных остатков в человеческий каркасный участок должна вызывать так называемые обратные мутации. Например, человеческий акцепторный аминокислотный остаток в положении 27 (по Кэботу) подвергали обратной мутации с заменой на остаток тирозина. Конструировали варианты гуманизированного антитела, которые либо включали, либо не включали обратные мутации. Легкая цепь гуманизированного антитела не требовала наличия никаких обратных мутаций. После создания белковых последовательностей синтезировали последовательности ДНК, кодирующие эти белки, согласно описанному ниже методу.

Подход, основанный на использовании смешанного каркасного участка Для того, чтобы избежать интродукции обратных мутаций в имеющие решающее значение положения аминокислотных остатков (имеющих решающее значение для сохранения высокой аффинности в отношении связывания с антигеном или функций антитела) в человеческом акцепторном каркасном участке, проводили исследование того, можно ли весь каркасный участок 1 (FR1) или каркасные участки 1 (FR1) и 2 (FR2) вместе заменять последовательностями человеческого антитела, уже несущими донорные остатки, или их функциональными вариантами, в этих важных положениях встречающейся в естественных условиях человеческой последовательности зародышевой линии. Для этой цели проводили индивидуальный сравнительный анализ каркасных участков 1 и 2 последовательности VH мышиногo Bly1 и человеческих последовательностей зародышевой линии. В данном случае максимально высокая степень идентичности последовательностей была не важна и ее не использовали при выборе акцепторных каркасных участков, предполагалось, что вместо этого более важным являлось совпадение нескольких остатков, имеющих решающее значение. К таким имеющим решающее значение остаткам относятся остатки 24, 71 и 94 (нумерация согласно Кэботу), а также остатки в положениях 27, 28 и 30 (нумерация согласно Кэботу), которые расположены вне CDR1 согласно Кэботу, но которые часто принимают участие в связывании с антигеном. В качестве пригодной IMGT-последовательности была выбрана VH_3_15. После создания белковых последовательностей синтезировали последовательности ДНК, кодирующие эти белки, согласно описанному ниже методу. При использовании указанного подхода для сохранения высоких уровней связывания с антигеном не требовались обратные мутации ни для легкой, ни для тяжелой цепи.

Синтез генов антитела.

После создания аминокислотной последовательности V-области гуманизированного антитела конструировали последовательность ДНК. Данные для последовательностей ДНК индивидуальных каркасных участков получали из баз данных последовательностей человеческой зародышевой линии. Последовательности ДНК CDR-участков получали из соответствующих данных мышинных кДНК. С использованием этих последовательностей создавали полную виртуальную последовательность ДНК. С учетом данных о этой последовательности ДНК в виртуальную последовательность интродуцировали диагностические сайты рестрикции, создавая путем интродукции "молчащих" мутаций сайты, распознаваемые рестриктазами. Для получения физической цепи ДНК осуществляли синтез гена (например, согласно методу, описанному Wheeler и др. 1995). С помощью этого метода на основе представляющих интерес генов создавали олигонуклеотиды таким образом, что одну серию олигонуклеотидов получали из коди-

рующей цепи, другую серию - из некодирующей цепи. 3'- и 5'-концы каждого олигонуклеотида (за исключением самого первого и самого последнего в ряду) всегда имели комплементарные последовательности для двух праймеров, полученных из другой цепи. Когда эти олигонуклеотиды помещали в реакционный буфер, пригодный для любой термостойкой полимеразы, и добавляли Mg^{2+} , дНТФ и ДНК-полимеразу, то происходило удлинение каждого олигонуклеотида на его 3'-конце. Затем новый образовавшийся 3'-конец одного праймера отжигали со следующим праймером другой цепи и проводили дальнейшее удлинение его последовательности в условиях, пригодных для зависящего от матрицы удлинения цепи ДНК. Конечный продукт клонировали в пригодном векторе для размножения в *E. coli*.

Производство антител.

С использованием стандартных методов молекулярной биологии лидерные последовательности человеческой тяжелой и легкой цепи (для секретиции) добавляли против хода транскрипции относительно указанных выше последовательностей вариабельных областей и затем их присоединяли против хода транскрипции к константной области тяжелой и легкой каппа-цепи человеческого IgG1, соответственно. Полученные полные последовательности ДНК тяжелой и легкой цепи антитела субклонировали в экспрессионных векторах млекопитающих (один для легкой цепи и один для тяжелой цепи) под контролем MPSV-промотора и против хода транскрипции относительно синтетического polyA-сайта, при этом каждый вектор нес последовательность OriP EBV как описано выше в примере 1. Антитела получали согласно методу, описанному выше в примере 1, а именно, осуществляли котрансфекцию клеток HEK293-EBNA с использованием экспрессионных векторов для тяжелой и легкой цепи антитела млекопитающего, собирали кондиционированную среду для культивирования через 5-7 дней после трансфекции и очищали секретированные антитела с помощью аффинной хроматографии на протеине А, катионообменной хроматографии и гель-фильтрации на конечной стадии с выделением чистого мономерного антитела в виде IgG1. Антитела помещали в среду, содержащую 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ раствор глицина, pH 6,7. Варианты гуманизированных антител со сконструированной схемой гликозилирования получали путем котрансфекции с использованием экспрессионных векторов для антител в сочетании с экспрессионными векторами для гликозилтрансферазы GnT-III или с GnT-III-экспрессионным вектором и экспрессионным вектором для маннозидазы II комплекса Гольджи, как это описано выше в примере 1 для химерного антитела. Антитела со сконструированной схемой гликозилирования очищали и приготавливали для дальнейшего анализа согласно описанному выше методу создания антител, не имеющих сконструированную схему гликозилирования. Олигосахариды, присоединенные к Fc-области антитела, анализировали с помощью MALDI/TOF-МС согласно описанному ниже методу.

Анализ олигосахаридов.

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

Приготовление образцов для MALDI/TOF-МС.

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

MALDI/TOF-МС.

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

Анализ связывания с антигеном.

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

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

Человеческие NK-клетки выделяли из свежеевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), используя для обогащения отрицательную селекцию CD16- и CD56-позитивных клеток (система MACS, фирма Miltenyi Biotec GmbH, Бергш Гладбах, Германия). Чистота, которую оценивали

по экспрессии CD56, составляла 88-95%. Свежевыделенные NK-клетки инкубировали в ЗФР без ионов кальция и магния (3×10^5 клеток/мл) в течение 20 мин при 37°C для удаления связанного с NK-клетками IgG. Клетки инкубировали до концентрации 10 клеток/мл в присутствии различных концентраций антитела к CD20 (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 мкг/мл) в ЗФР, 0,1% БСА. После нескольких отмывок связывание антитела оценивали путем инкубации с конъюгированным (1:200) с FITC F(ab')₂-фрагментом козы антитела, специфическим в отношении F(ab')₂ человеческого IgG (фирма Jackson ImmunoResearch, Вест Гроу, шт. Пенсильвания, США) и античеловеческим CD56-PE (фирма BD Biosciences, Алшвил, Швейцария). Добавляли F(ab')₂-фрагменты антитела к FcγRIIIA 3G8 (фирма Ancell, Байпорт, шт. Миннесота, США) в концентрации 10 мкг/мл для конкурентного связывания гликозилированных вариантов антитела (3 мкг/мл). Интенсивность флуоресценции, характеризующую варианты связанного антитела, определяли для CD56-позитивных клеток с помощью устройства FACSCalibur (фирма BD Biosciences, Алшвил, Швейцария). СНО-клетки трансфектировали путем электропорации (280 В, 950 мкФ, 0,4 см) экспрессионным вектором, кодирующим α-цепь и γ-цепь FcγRIIIA-Val158. Отбор трансфектантов проводили путем добавления 6 мкг/мл пурамицина на 10 клеток и стабильные клоны анализировали с помощью FACS с использованием 10 мкл конъюгированного с FITC моноклонального антитела к FcγRIIIA 3G8 (фирма BD Biosciences, Алшвил, Швейцария). Связывание IgG1 с экспрессирующими FcγRIIIA-Val158 СНО-клетками осуществляли аналогично описанному выше связыванию с NK-клетками.

Анализ ADCC.

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

Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней, которое использовали для ADCC-анализов, составляло 25:1 и 10:1 для PBMC и NK-клеток соответственно. Эффекторные клетки приготавливали в среде AIM-V в соответствующей концентрации и вносили по 50 мкл на лунку в круглодонные 96-луночные планшеты. Клетки-мишени, представляли собой клетки человеческой В-лимфомы (например, клетки линии Raji), выращенные в среде DMEM, содержащей 10% ФТС. Клетки-мишени промывали ЗФР, подсчитывали и ресуспендировали в среде AIM-V до концентрации 0,3 миллиона/мл из расчета 30000 клеток на 100 мкл. Антитела разбавляли AIM-V, добавляли 50 мкл к предварительно высеванным клеткам-мишеням и давали связываться с мишенями в течении 10 мин при КТ. Затем добавляли эффекторные клетки и планшет инкубировали в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Гибель клеток-мишеней оценивали путем измерения высвобождения лактатгидрогеназы (ЛДГ) из поврежденных клеток с использованием набора для определения цитотоксичности (фирма Roche Diagnostics, Роткрейц, Швейцария). После инкубации в течение 4 ч планшеты центрифугировали при 800×g. 100 мкл супернатанта из каждой лунки переносили в новый прозрачный плоскодонный 96-луночный планшет. В каждую лунку добавляли по 100 мкл цветного субстратного буфера из набора. Величины V_{max} цветной реакции определяли с помощью ридера для ELISA при длине волны 490 нм в течение по меньшей мере 10 мин с использованием пакета программ SOFTmax PRO (фирма Molecular Devices, Саннивалле, шт. Калифорния, 94089, США). Спонтанное высвобождение ЛДГ оценивали в лунках, содержащих только клетки-мишени и эффекторные клетки, но не содержащих антитела. Максимальное высвобождение определяли в лунках, содержащих только клетки-мишени и 1% Triton X-100. Процент специфической опосредуемой антителом гибели рассчитывали по следующей формуле:

$$((x-SR)/(MR-SR) \times 100,$$

где x обозначает среднее значение V_{max} при конкретной концентрации антитела, SR обозначает среднее значение V_{max} при спонтанном высвобождении и MR обозначает среднее значение V_{max} при максимальном высвобождении.

Анализ комплементзависимой цитотоксичности.

Клетки-мишени подсчитывали, промывали ЗФР, ресуспендировали в среде AIM-V (фирма Invitrogen) до концентрации 1 млн клеток/мл. Высевали по 50 мкл клеток на лунку в плоскодонный 96-луночный планшет. Приготавливали разведения антитела в AIM-V и по 50 мкл добавляли к клеткам. Антителам давали связываться с клетками в течение 10 мин при комнатной температуре. Свежеоттаянный комплемент человеческой сыворотки (фирма Quidel) разбавляли тремя объемами AIM-V и вносили по 50 мкл в лунки. Кроличий комплемент (фирма Cedarlane Laboratories) приготавливали согласно инструкции.

ям производителя, разбавляли тремя объемами AIM-V и вносили по 50 мкл в лунки. Для контроля перед внесением в среду для анализа источники комплемента выдерживали в течение 30 мин при 56°C.

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

Анализ В-клеточного истощения цельной крови.

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

Анализ апоптоза.

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

Обнаружение проводили с помощью проточной цитометрии путем выявления апоптозных маркеров, таких как аннексин V и фосфатидилсерин. Образцы для отрицательного контроля (без индукции апоптоза) не содержали никаких антител, а содержали только забуференный фосфатом физиологический раствор. Образцы для положительного контроля (максимальный апоптоз) содержали 5 мкМ сильного индуктора апоптоза камфотецина (CPT).

Результаты и обсуждение.

Сравнение связывания с человеческим антигеном CD20 вариантов антитела В-НН1, В-НН2, В-НН3 либо в комплексе с легкой цепью химерного антитела B-ly1 (mVL, полученного согласно методу, описанному в примере 1), либо с легкой цепью гуманизированного B-ly1 (KV1), и родительского химерного антитела chB-ly1 (описанного выше в примере) позволило установить, что все антитела имели близкие значения EC_{50} , но конструкция В-НН1 связывалась с меньшей интенсивностью/стехиометрией, чем варианты В-НН2 и В-НН3 (фиг. 11). В-НН1 отличался от В-НН2 и В-НН3 своими частично гуманизированными участками CDR1 и CDR2 (определение Кэбота), а также наличием полиморфизма Ala/Thr в положении 28 (нумерация согласно Кэботу). Это свидетельствует о том, что как положение 28, так полный CDR1 и/или полный CDR2 являются важными для взаимодействия антитело/антиген.

Сравнение В-НН1, В-НН1 и химерного родительского антитела chB-ly1 позволило установить, что у конструкции В-НН1 отсутствовала какая-либо связывающая активность, а интенсивность связывания/стехиометрия В-НН1 была примерно в два раза меньше, чем у B-ly1 (фиг. 12). Как В-НН1, так и В-НН1 были сконструированы на основе акцепторных каркасных участков, выведенных из человеческих переменных областей VH1-класса. Среди других различий наиболее важным является различие в положении 71 (нумерация согласно Кэботу; положение 71 по Кэботу соответствует положению 72 SEQ ID NO: 48) конструкции В-НН1, что указывает на его возможную важную роль в связывании с антигеном.

Из сравнения представленных на фиг. 9-13 данных о связывании с антигеном видно, что варианты ВНН2-KV1, ВНН8-KV1 и ВНН11-KV1 обладали наиболее высокой аффинностью к связыванию с человеческим CD20 на поверхности человеческих клеток среди различных протестированных вариантов гуманизированного антитела. Различия между В-НН2, с одной стороны, и В-НН8 и В-НН11, с другой стороны, присутствуют только в FR1- и FR2-участках, причем все три CDR являются идентичными (что видно, например, из сравнения SEQ ID NO: 32, 56 и 60, которые не пронумерованы согласно Кэботу, но для которых обычный специалист в данной области легко может установить нумерацию согласно Кэботу). Для В-НН8 и В-НН11 последовательности FR1 и FR2 выводили из последовательностей человеческой переменной области VH3-класса, в то время как полный каркасный участок В-НН2 выводили из человеческой VH1. В-НН11 представляет собой производное В-НН8, несущее одиночную мутацию Glu1Gln (положение 1 является одинаковым как в нумерации согласно Кэботу, так и в стандартной системе нумерации, использованной в перечне последовательностей), при этом в конструкции В-НН2 аминокислотный остаток представляет собой Gln. Это означает, что замена Glu1Gln не изменяет ни аффинность, ни интенсивность связывания. Другие различия между В-НН2 и В-НН8 касаются 14 остатков каркасного участка, из которых один или несколько могут оказывать влияние на способность этого антитела связываться с антигеном.

Конструкцию В-НН4 получали из антитела В-НН2 путем замены FR1 В-НН2 участком последовательности VH145 человеческой зародышевой линии. Эта конструкция обладает существенно более низкой способностью к связыванию с антигеном, несмотря на то, что аминокислотные различия присутствуют только в трех положениях в FR1. Эти остатки находятся в положениях 2, 14 и 30 (нумерация согласно Кэботу). Среди них положение 30 может являться положением, оказывающим влияние, поскольку оно является частью CDR1 согласно определению Хотиа. Общий анализ всех представленных на фиг. 9-

13 кривых, характеризующих связывание, показывает, что для связывания с CD20 важны следующие остатки тяжелой цепи гуманизированного B-ly1 (нумерация согласно Кэботу): N35 (конец CDR1 согласно Кэботу), полный CDR1 согласно Кэботу, полный CDR2 согласно Кэботу и полный CDR3 согласно Кэботу, остатки A71 и R94 (в этом случае остаток R94 не может быть заменен на треонин) и Y27. A28 и S30 также могут оказывать влияние, но в меньшей степени. Кроме того, для связывания с антигеном важны CDR3 согласно Кэботу и все канонические остатки. В гуманизированную легкую цепь, в которую трансплантировали полные CDR1-, CDR2- и CDR3-участки (согласно Кэботу), не интродуцировали никаких обратных мутаций. В отношении индукции апоптоза (фиг. 14, 15 и 21) наиболее эффективным вариантом оказался гуманизированный вариант B-ly1 BHN2-KV1 (даже более эффективным, чем исходное chB-ly1 и намного более эффективным, чем антитело, имеющее последовательность, идентичную последовательности ритуксимаба, C2B8). Другими гуманизированными вариантами (производными BHL8), которые могли вызывать усиленный апоптоз, оказались: B-HL12 - B-HL17 (см. таблицу) и BHN8 (смешанные каркасные участки) и BHN9 ("смешанные каркасные участки" с одной обратной мутацией, S30T). Положения 9 и 48 (нумерация согласно Кэботу) могут контактировать с антигеном. Варианты BHN4 - BHN7 представляют собой другие гуманизированные варианты B-ly1, которые не несут дополнительных отличных от человеческих последовательностей.

Важные свойства гуманизированного антитела B-ly1 обусловлены тем, что оно представляет собой антитело типа II к CD20 согласно определению, которое дано у Cragg M.S. и Glennie M.J., Blood 103(7), апрель 2004 г., сс. 2738-2743. Вследствие этого при связывании с CD20 оно не индуцирует какой-либо устойчивости к экстракции неионными детергентами CD20 с поверхности человеческих CD20+-клеток при анализе с использованием предназначенного для этой цели метода, который описан у Polyak M.J. и Deans J.P., Blood 99(9), 2002, сс. 3256-3262. Оно действительно индуцирует существенно меньшую устойчивость к экстракции неионными детергентами CD20, чем антитело C2B8 (другое антитело к CD20, имеющее последовательность, идентичную с последовательностью ритуксимаба (см. публикацию патента США № 2003 0003097 на имя Reff). Как следует ожидать для антитела типа II к CD20, гуманизированное B-ly1 не обладает какой-либо значительной опосредуемой комплементом литической активностью и конечно меньшей опосредуемой комплементом литической активностью, чем антитело к CD20 C2B8 (химерный IgG1, имеющий последовательность, идентичную последовательности ритуксимаба). Другой важной особенностью гуманизированного антитела B-ly1 является то, что оно обладает очень большой активностью в анализе гомотипической агрегации. В этом анализе CD20-позитивные человеческие клетки, клетки Дауди, инкубировали в среде для культуры клеток в течение периода времени вплоть до 24 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в инкубаторе для клеток млекопитающих согласно подробно описанному методу (см. Deans) с антителом в концентрации 1 мкг/мл и параллельно в концентрации 5 мкг/мл. Для сравнения параллельно проводили контрольную инкубацию клеток в идентичных условиях, но с использованием антитела к CD20 C2B8. В различные моменты времени, в том числе после инкубации в течение 8 и 24 ч клетки визуально обследовали с помощью микроскопа. Было установлено, что гуманизированное антитело B-ly1 приводит к сильной гомотипической агрегации, причем агрегаты были существенно крупнее, чем те, которые индуцировались при добавлении контрольного антитела C2B8. Кроме того, в соответствии с тем, что антитело является антителом типа II к CD20, оно индуцировало более высокие уровни апоптоза, когда CD20-позитивные человеческие клетки инкубировали с гуманизированным антителом B-ly1, по сравнению с контрольным опытом, проводимым в идентичных условиях с использованием химерного антитела в виде IgG1, C2B8, имеющего последовательность, идентичную последовательности ритуксимаба.

Варианты гуманизированного антитела со сконструированной схемой гликозилирования получали в клетках млекопитающих путем коэкспрессии гликозилтрансферазы GnTIII совместно с генами антител. Это приводило к увеличению фракции нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к Fc-области антител, включая бисекционные нефукозилированные олигосахариды, как это описано в WO 2004/065540 (фиг. 17-19). Антитела со сконструированной схемой гликозилирования обладают существенно большими уровнями связывания с человеческими FcγRIII-рецепторами (фиг. 20), а также большей ADCC-активностью (фиг. 16) по сравнению с антителом с несконструированной схемой гликозилирования и по сравнению с антителом C2B8. Гуманизированное антитело B-ly1 оказалось также более эффективным в отношении индукции истощения человеческих В-клеток при анализе цельной крови (фиг. 16), чем контрольное антитело C2B8. Это имело место как для антитела B-ly1 с несконструированной схемой гликозилирования, так и для его версии со сконструированной схемой гликозилирования. Антитело со сконструированной схемой гликозилирования оказалось примерно в 1000 раз более эффективным в отношении В-клеточного истощения при анализе цельной крови, чем контрольное антитело к CD20 C2B8. Это сравнение имеет большое значение для гуманизированных форм антитела B-ly1, как с несконструированной схемой гликозилирования, так и со сконструированной схемой гликозилирования, поскольку в анализах, объединяющих оценку зависящих от Fc-рецептора видов активности, таких как ADCC, опосредуемого комплементом лизиса и индукции апоптоза установлено, что обе формы B-ly1 существенно более эффективны, чем C2B8, хотя обе формы B-ly1 обладают существенно более низкой опосредуемой комплементом литической активностью. Такая более высокая активность гуманизированных вариантов

антитела B-ly1 включает ADCC, Fc-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность и индукцию апоптоза. Кроме того, в анализе апоптоза формы этого антитела типа II к CD20 как со сконструированной схемой гликозилирования, так и с несконструированной схемой гликозилирования, оказались более эффективными, причем варианты со сконструированной Fc-областью, обладающие повышенной аффинностью к связыванию с Fcγ-рецепторами, оказались даже более эффективными в отношении индукции апоптоза, чем вариант с несконструированной Fc-областью, и все варианты имели более высокую эффективность, чем контрольное антитело C2B8. Точный механизм повышенной гомотипической агрегации и индукции апоптоза, опосредуемый антителом типа II к CD20 не изучен и на это важное свойство может оказывать влияние сопутствующее связывание с другими молекулами на поверхности CD20-позитивных клеток, таких как Fcγ-рецепторы. Поэтому важно продемонстрировать, что антитела типа II к CD20, у которых сконструирована их Fc-область для повышения аффинности к связыванию с Fcγ-рецепторами, включая FcγRIII, и для связанного с этим повышения ADCC-активности, все еще обладают выраженной способностью индуцировать апоптоз, даже превышающей способность антител с несконструированной Fc-областью, и индуцируют гомотипическую агрегацию. Индукция апоптоза важна *in vivo*, поскольку в организме имеются области, в которых могут находиться CD20-позитивные клетки-мишени, но где доступ к FcγRIII-позитивным клеткам более затруднен, чем в крови, такими областями являются, например, лимфатические узлы. В таких местах индукция апоптоза антителом к CD20 сама по себе может иметь решающее значение для хорошей эффективности терапии человека с использованием антител к CD20, как при лечении злокачественных гематологических заболеваний, таких как неходжкинские лимфомы и хронический В-клеточный лимфолейкоз, так и для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и волчанка, посредством В-клеточного истощения. Повышенная аффинность к связыванию с FcγRIII и более высокая ADCC гуманизированного антитела типа II к CD20 со сконструированной Fc-областью может иметь очень большое значение для таких методов лечения. Наконец, пониженная или незначительная опосредуемая комплементом литическая активность этого антитела типа II к CD20, включая гуманизированные варианты и варианты со сконструированной Fc-областью, может быть важным, поскольку более высокая активация комплемента антителом к CD20 коррелирует с более сильными нежелательными побочными действиями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

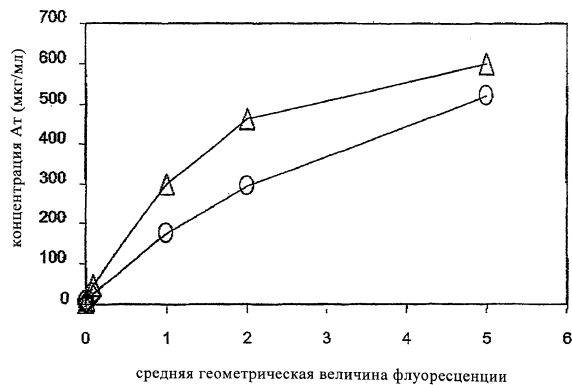
1. Гуманизированное антитело типа II к CD20, включающее:
 - (a) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 46; и
 - (b) вариабельную область KV1 легкой цепи SEQ ID NO: 76, где указанное антитело имеет повышенное количество нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к подвергнутому гликоинжинерингу Fc участку.
2. Гуманизированное антитело типа II к CD20, включающее:
 - (a) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 72; и
 - (b) вариабельную область KV1 легкой цепи SEQ ID NO: 76, где указанное антитело имеет повышенное количество нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к подвергнутому гликоинжинерингу Fc участку.
3. Фармацевтическая композиция для лечения В-клеточных расстройств, содержащая антитело по любому из пп.1-2 и фармацевтически приемлемый носитель
4. Применение антитела по любому из пп.1-2 для получения лекарственного средства для лечения В-клеточных расстройств.
5. Применение по п.4, где В-клеточным расстройством является В-клеточная лимфома.
6. Применение антитела по любому из пп.1-2 для получения лекарственного средства для лечения расстройств, которые можно излечить истощением В-клеток.
7. Применение по п.6, где указанным расстройством, которое можно излечить истощением В-клеток, является неходжкинская лимфома или В-клеточная хроническая лейкоцитарная лейкемия.
8. Антитело по любому из пп.1-2, которое имеет повышенное количество бисекционных нефукозилированных олигосахаридов, присоединенных к указанному подвергнутому гликоинжинерингу Fc участку.

Линкер	Начало SEQ ID NO:1 (аминокислотная последовательность) и SEQ ID NO:2 (нуклеотидная последовательность)
1	GAGGTCGAAGC TGCAGCAGTC T CTCCAGTTCG ACGTGCTCAG A E V K L Q Q S >>.....B-Ly1 vh.....>>
101	TGAACCTGGT GAAACTGAGG CTTGGACAGG GTCTTGAGTG GATTGGACGG ATTTTCTCTG GAGATGGGGA TACTGACTAC AATGGGAAAT TCAAGGGCAA ACTTGACCCA CTTTGACTCC GGAACCTGCC CAGAACCTAC CTAACCTGCC TAAAGAGGAC CTCTACCCCT ATGACTGATG TTACCCCTTA AGTCCCGTT M N W V K L R P G Q G L E W I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G >.....B-Ly1 vh.....>
201	GGCCACACTG ACTGCTGACA AATCTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA CAGCCTGAC CTCTGTGGAC TCTGGGTCT ATTTATGTGC AAGAAATGTC CCGGTGTGAC TGACGACTGT TTAGGAGGTT GTGTCGGATG TACGTTGAGT GGTGCGACTG GAGACACCTG AGACGCCAGA TAAATACAG TTCTTTACAG K A T L T A D K S S N T A Y M Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V >.....B-Ly1 vh.....>
301	TTTGATGGTT ACTGGTTAGT TTACTGGGGC CAAGGGACTC TGSTCACTGT CTCTGCA AAACACCAA TGACCAATCA AATGACCCCG GTTCCCTGAG ACCAATGACA GAGACGT F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S A >.....B-Ly1 vh.....>

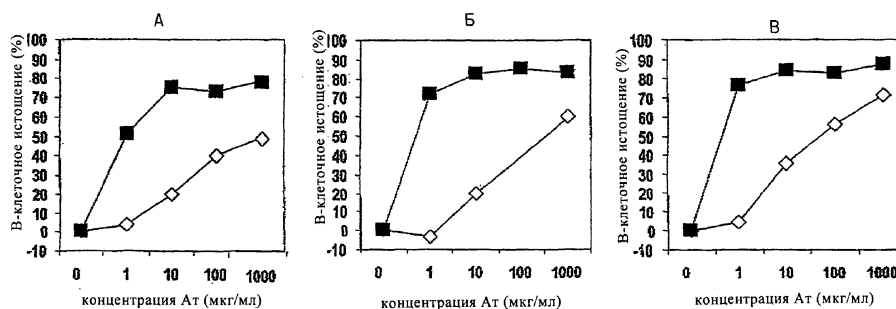
Фиг. 1

Линкер	Начало SEQ ID NO:1 (аминокислотная последовательность) и SEQ ID NO:2 (нуклеотидная последовательность)
БрhI	GACATTGTGC TCACCCAAAC TACA AATCCA GTCACTCTTG GAACATCAGC TTCCATCTCC TGCAGGTCTA GTAAGAGTCT CCTACATAGT AATGGCATCA CTGTAACACG AGTGGGTTTG ATGT TTAGGT CAGTGAGAAC CTTGTAGTGC AAGGTAGAGG ACCTCCAGAT CATCTCAGA GGATGTATCA TTACCGTAGT D I V L T Q T T N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I >>.....B-Ly1 v.1.....>>
BseRI	CTTATTGTGA TTGTTATCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC TCAAGTCTTG ATTATCAGA TGTCCAACT TGTCTCAGGA GTCCAGACA GGTTCAGTAG GAATAACAT AACCATAGAC GTCTTCGGTC CGGTGAGAGC ATGTCAGGAC TAAATAGTCT ACAGGTTGGA ACAGAGTCTC CAGGGTCTGT CCAAGTCATC T Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S >.....B-Ly1 v.1.....>
MmeI	CAGTGGGTCA GGAAGTGAAT TCACTAGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATGTGGG TGTATTATC TGTGCTCAA ATCTAGAAT TCCGTACACG GTCACCCAGT CTTGACTAA AGTGTGACTC TTAGTCTCT CACTCCGAC TCCTACACCC ACAATAATG ACACGAGTTT TAGATCTTGA AGGCATGTGC S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T >.....B-Ly1 v.1.....>
BtsI	TTCCGAGGGG GGACCAAGCT GGAATAAAA CGG AAGCCTCCCC CTTGGTTCGA CTTTATTTT GCC F G G G T K L E I K R >.....B-Ly1 v.1.....>
AflIII	

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

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

```

      SepI              MluI              PstI
      +-----+
1  ATGCGTTGGA GCTCATCTT GCTCTGCTT GTCCCTGTT CTACGCTGT CTGTGCGAG GTCAAGCTG AGCAGTCTG AACTGAAGT GTGAAGCGT
   TACCAACTT CGAGTAGAA CGAGAGGAA CAGGACACG GATGCGACA GACAGGCTC GATTCGAGG TCGTCAGAC TCGACTGAC CACTTCGAC
   M G W S L I L L F L V A V A T R V L S E V K L Q Q S G P E L V K P
>>.....B-Ly1 h.c.....>

      HindIII              StuI
      +-----+
101 GGGCCICAGT GAAGATTTC TGCAAGCIT CTGGCTACG ATTCACTAC TCTTGGATG ACTGGGTGA ACTGAGGCT GAGCAGGTC TTGATGGAT
   CCGGAGTCA CTCTAAGG ACCTTTCGAA GACGATGCG TAAGTCAATG AGAACCTACT TGACCCACTT TGACTCCGGA CTGTCCGAG AACTCACTA
   G A S V K I S C K A S G Y A F S Y S W M N W V K L R P G Q G L E W
>>.....B-Ly1 h.c.....>

201 TGGACGATT TTTCCTGAG ATGGGATAC TGACTACAT GGAATTCa AGGCAAGG CACTGACT GCTGACAA CTCCACAC AGCTACATG
   ACCTGCTTA AAGAGCTTC TACCCCTAG ACTGATGTA CCCTTAACT TCCCTTCG GGTGACTGA CACTGTITA GAGGTTGTG TCGGATGAT
   I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G K A T L T A D K S S N T A Y M
>>.....B-Ly1 h.c.....>

      PshAI
      +-----+
301 CAACTCACCA GCTGACCTC TGTGACTCT GCGTCTATT TATGTCAAG AAATGCTTT GATGGTACT GGTAGTITA CTGGGCCAA GGGACTCTG
   GTTCACTGT CGAGTGGAG ACACCTGAGA CCGCAGATA ATACAGTTC TTTCAGAAA TACCAATGA CCAATCAAT GACCCGCTT CCCTGAGAC
   Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L
>>.....B-Ly1 h.c.....>

      NheI
      +-----+
      PstI
      +-----+
401 TCACTGCTC TGACCTAGC ACCAAGGCG CATGGTCTT CCCCCTGCA CCCTCTCCA AGAGCACCTC TGGGGCACA GCGGCCCTG GCTGCTGGT
   AGTACAGAG ACCTGATCG TGGTTCGCG GTAGCCAGAA GGGGACCTT GGGAGGAGT TCTGTGGAG ACCCCGCTT CCGCCGAGC CAGCAGACCA
   V T V S A A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
>>.....B-Ly1 h.c.....>

```

Фиг. 5А

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

```

501 CAAGGACTAC TTCCCGAAC CGTGACGGT GTGTGGAAC TCAGGCGCC TGACGACGG CGTGACACC TTCCCGCTG TCTACAGTC CTCAGGACT
   GTTCTGATG AAGGGGCTT GCCACTGCA CAGCACCTT AGTCCGCGG ACTGGTCGC GCACGTGTG AAGGCGGAC AGGATGTCAG GAGTCTGAG
   V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L
>>.....B-Ly1 h.c.....>

601 TACTCTCTCA GCGAGTGTG GACCTGCCC TCCACAGCT TGCCACCCA GACCTACAT TGCACGTGA ATCAACAGC CAGCAACAC AAGGTGACA
   ATGAGGGAGT CCGTCCACA CTGGCACGG AGTCTGTGA ACCCTGGGT CTGGATGAT ACCTGCACT TAGTGTTCG GTCGTTGTG TTCCACCTGT
   Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
>>.....B-Ly1 h.c.....>

      AhdI
      +-----+
701 AGAAAGCAGA GCCCAATCT TGTACAAAA CTCACATG CCAACGTCG CCAGCACCTG AACTCTGGG GGAACGCTA GTCTTCTCT TCCCCCAAA
   TCTTCTGCT CGGTTTAGA ACATGTTTT GAGTGTGAC GGTGTGACG GTTGTGAC TTGAGGACC CCCTGCACT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT
   K K A E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L P P P
>>.....B-Ly1 h.c.....>

801 ACCCAAGGAC ACCCTCATG TCTCCGAGC CCCTGAGTC ACATGCGTG TGTGTGAGT GAGCCAGAA GACCTGAGG TCAAGTCAA CTGGTACGT
   TGGGTTCTG TGGGAGTACT AGAGGCGCT GGGACTCAG TGTACGACC ACCACTGCA CTGGTCTCT CTGGACTCC AGTTCAAGT GACCATGAC
   K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V
>>.....B-Ly1 h.c.....>

901 GACGCGTGG AGGTGCATTA TGCCAAAGA AAGCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAG TACCGTGTG TCAGCGTCT CACCGCTCT CACAGGACT
   CTGCGCAC CCAAGTATT AGGTTCTGT TTGGCGGCC TCCTGCTCAT GTTGTGTGC ATGGCACACC AGTCGAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTGA
   D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
>>.....B-Ly1 h.c.....>

1001 GCGTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAG TCTCCACAA AGCCCTCCCA GCGCCCATG AGAAAACCAT CTCGAAAGC AAAGGGCAGC CCGGAGACC
   CCGACTTAC GTTCTCATG TTCAGTTC AGAGGTGTT TCGGAGGCT CGGGGTAGC TCTTTGTA GAGGTTTCG TTTCGCTCG GGGCTCTTG
   W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
>>.....B-Ly1 h.c.....>

```

Фиг. 5Б

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

```

      SmaI
      +-----+
1101 ACAGGTGAC ACCCTGCCCC CATCCCGGA TGAGCTGACC AGAACCAGG TCAGCTGAC CTGCTGTGC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGT
   TGTCCACATG TGGGACGGG GTAGGCGCT ACTGACTGG TTCTGTGTC AGTCGAGCTC GACGAGCAG TTTCGAGA TAGGCTGCT GTAGCGCAC
   P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
>>.....B-Ly1 h.c.....>

1201 GAGTGGAGA GCAATGGCA CCGGAGAAC AACTACAGA CCACGCTCT GGTCTGGAC TCGACGCT CTCTCTTCT CTACAGCAG CTCACCGTG
   CTCACCTCT CGTTACCGT CCGCTCTTG TTGATGTTT GTTGTGAGT GCACGACCT AGGCTGCGA GGAAGAAGA GATGTGTTT GAGTGGCAC
   E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V
>>.....B-Ly1 h.c.....>

      SapI
      +-----+
1301 ACAAGAGCAG GTGCAACAG GGAAGCTCT TCTATGCTC CTGATGAT GAGGCTTGC ACAACACTA CAGCAGAG AGCTCTTCCC TGTCTCCGG
   TGTCTCTG CACCTCTCT CCCTTGCAG AGAGTACAG GCACTACGA CTCCGAGAG TTTTGTGAT GTGCTCTTC TCGAGAGGG ACAGAGGCC
   D K S R W Q Q G N V F S C S V M H A L H N H Y T Q K S L S L S F
>>.....B-Ly1 h.c.....>

1401 TAAATGA
   ATTACT
   G K -
>>.....B-Ly1 h.c.

```

Фиг. 5В

```

1  ATGGATTTC AGGTGCAGAT TATCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC AGAGGAGACA TTGTGCTCAC CCAACTACA AATCCAGTCA
TACCTAAAAG TCCAGCTCTA ATAGTCGAAG GACGATTAGT CACGAGTCA GTATTACAGG TCTCTCTGT AACACGAGTG GGTITGATGT TTAGTCCAGT
M D F Q V Q I I S F L L I S A S V I M S R G D I V L T Q T T N P V
>>.....B-Ly1 1.c.....>>

          PstI                      PstI
          ----+-----
101 CTCTGGGAGC ATCAGCTTCC ATCTCTGCA GGTCTAGTAA GAGTCTCCTA CATAGTAATG GCATCACTTA TTGTGATGGT TATCTGCAGA AGCCAGGCCA
GAGAACCCTTG TAGTCGAAGG TAGAGGACGT CCAGATGATT CTCAGAGGAT GTATCATTAC CTAATGTAAT AACATAACC ATAGACGTCT TCGGTCCGGT
T L G T S A S I S C R S S R S L L H S N G I T Y L Y W Y L Q K P G
>.....B-Ly1 1.c.....>>

101 GTCTCCTCAG CTCCTGATTT ATCAGATGTC CAACCTTGTG TCAGGAGTCC CAGACAGGTT CAGTAGCAGT GGGTCAGGAA CTGATTTTAC ACTGAGATC
CAGAGGAGTC GAGGACTAAA TAGTCTACAG GTTGGAAACAG AGTCCTCAGG GTCTGTCCAA GTCATCGTCA CCCAGTCTTT GACTAAAGTG TGAATCTTAG
Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I
>.....B-Ly1 1.c.....>>

          XbaI                      BsiWI
          ----+-----
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGTGTT TATTACTGTG CTCAAAATCT AGAACTTCCG TACACGTTGG GAGGGGGGAC CAAGCTGGAA ATAAAACGTA
TCGTCTCAAC TCCGACTCCT ACACCCACAA ATATGACAC GAGTTTITAGA TCTTGAAGGC ATGTGCAAGC CTCGCCCTTG GTTCGACCTT TATTTTGCAT
S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T F G G G T K L E I K R
>.....B-Ly1 1.c.....>>

          XmnI
          ----+-----
401 CGGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCTCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCTCTGTG TGTGTGCTTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
GCCACCGACG TGGTAGCAGG AAGTAGAAGG GCGGTAGACT ACTGCTCAAC TTATGACCTT GACGGAGACA ACACACGGAC GACTTATTTGA AGATAGGGTC
T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
>.....B-Ly1 1.c.....>>

501 AGAGGCCAAA GTACAGTGA AGGTGGATTA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT CCCAGGAGG TGTCAAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
TCTCGGTTT CATGTCACTT TCCACCTATT GCGGGAGGTT AGCCCATTTGA GGGTCTCTC ACAATGTCTC GTCTGTGCTT TCTGTGCTG GATGTGGGAG
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
>.....B-Ly1 1.c.....>>

```

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

Фиг. 6А

```

          SacI
          ----+-----
601 AGCAGCACCC TGAAGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAACC ACAAGTCTTA CGCTGCCGAA GTCAACCCATC AGGGCCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAGAGGCT
TCGTCTGCGG ACTCCGACTC GTTTCGTCTG ATGCTCTTTG TGTTCAGAT GCAGACGCTT CAGTGGGTAG TCCCGGACTC GAGCGGGCAG TGTTCCTCGA
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S
>.....B-Ly1 1.c.....>>

701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG
AGTTGTCCCC TCTCAATC
F N R G E C -
>....B-Ly1 1.c.....>>

```

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

Фиг. 6Б

А

CDR1 (Кэбот): TACTCTTGGATGAAC TyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 15
CDR1 (Хотия): GGCTACGCATTCACTTAC GlyTyrAlaPheSerTyr	SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 16
CDR1 (МАТ): GGCTACGCATTCACTTACTCTTGGATGAAC GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 17
CDR2 (Кэбот): CGGATTTTCTCGAGATGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 25
CDR2 (Хотия): TTTCTGGAGATGGGATACTGAC PheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 26
CDR2 (МАТ): CGGATTTTCTCGAGATGGGATACTGAC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 27
CDR2 (Кэбот, Хотия, АСМ): AATGCTTTGATGGTACTGGTTAGTTTAC AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr	SEQ ID NO: 24 SEQ ID NO: 28

Б

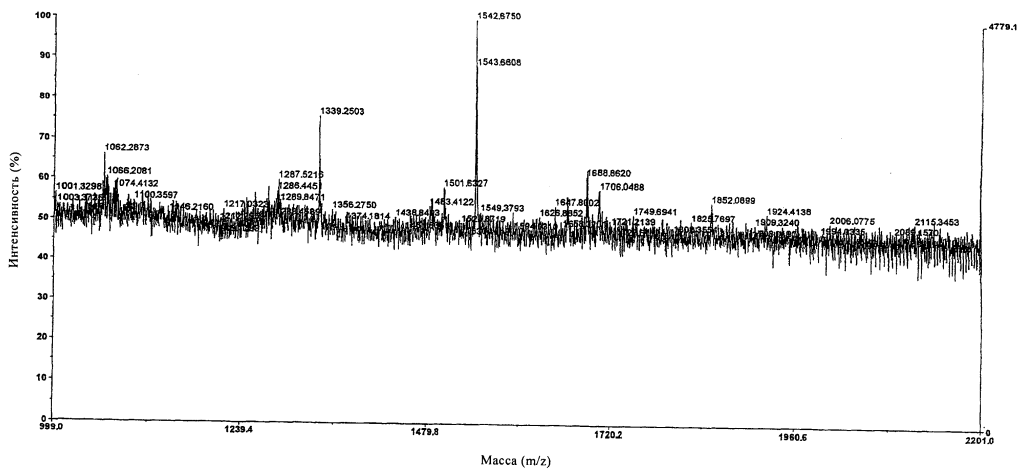
CDR1 (Кэбот): AGGTCTAGTAAGAGTCTCTACATAGTAATGGCATCACTTATTGTAT ArgSerSerLysSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr	SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 18
CDR2 (Кэбот): CAGATGTCCAACCTTGICTCA GlnMetSerAsnLeuValSer	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 19
CDR3 (Кэбот): GCTCAAAATCTAGAACTCCGTACACG AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr	SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 20

Фиг. 7

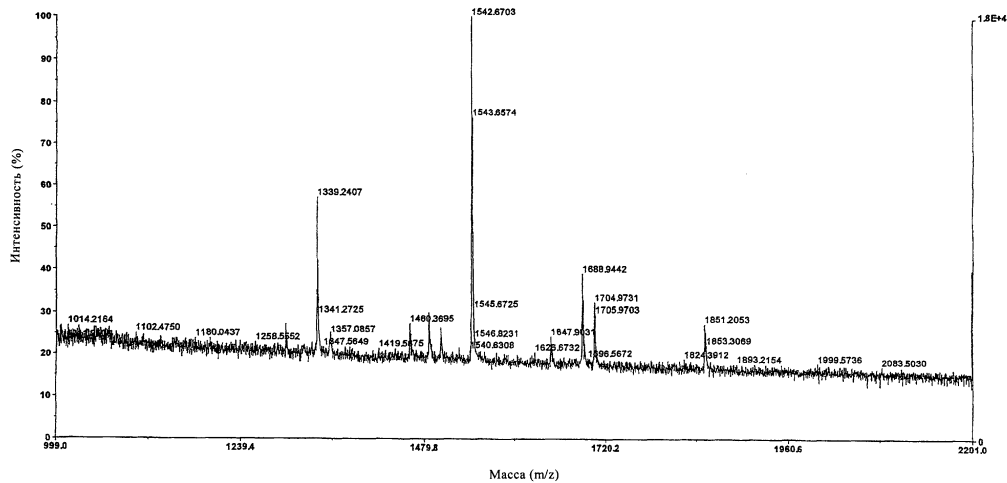
относительные величины в процентах

	+ EndoH	
	Bly-1 m1	Bly-1 m1
	031024	031024
	016	017
1053		
1256		
1282		
1298		3.70%
1339	18.60%	17.90%
1460		4.30%
1486	5.90%	5.50%
1502	5.10%	3.70%
1543	35.00%	39.20%
1622		
1647	4.60%	3.00%
1664	7%	
1680		
1688	11.00%	10.30%
1705	7.20%	7.30%
1810		
1826		
1850	5.90%	5.20%
1972		
2012		
	100%	100%

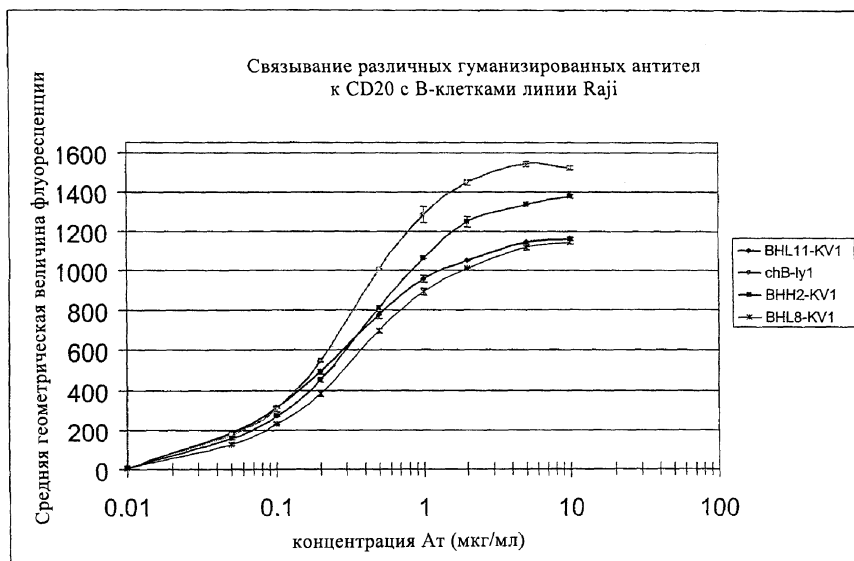
Фиг. 8А



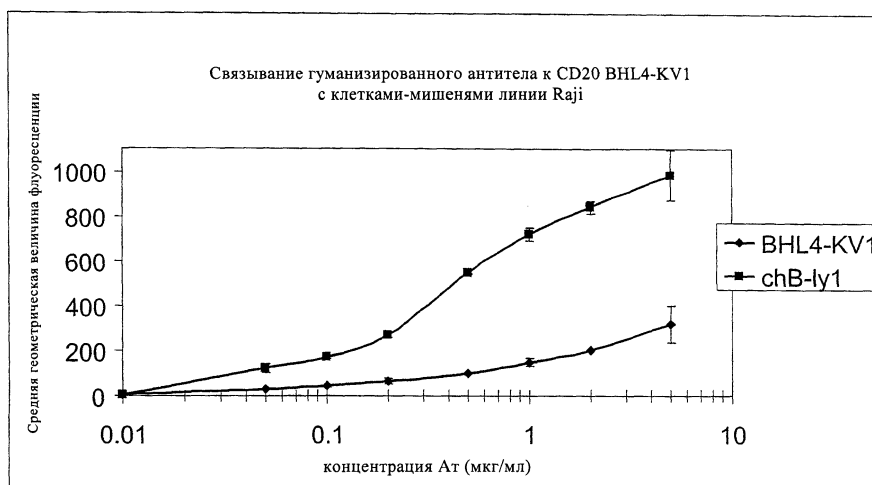
Фиг. 8Б



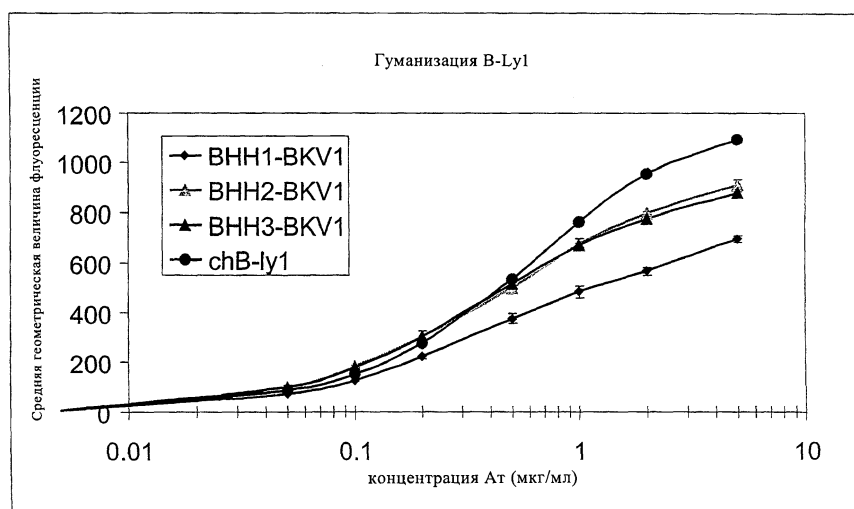
Фиг. 8В



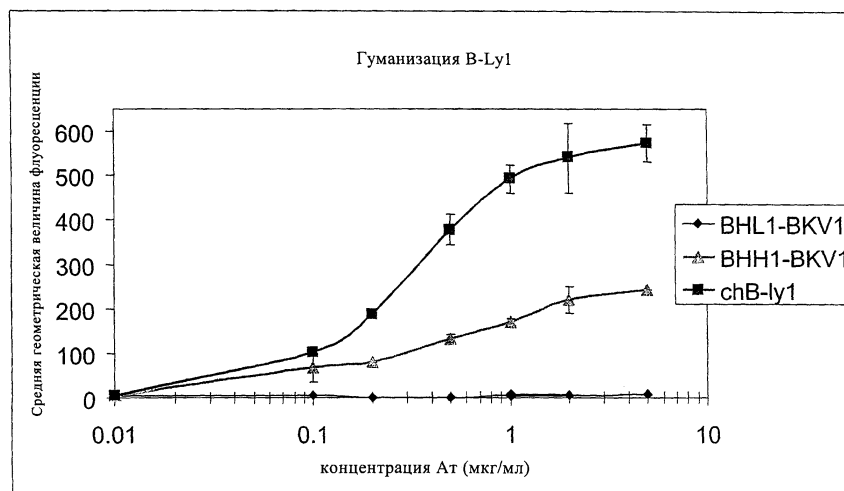
Фиг. 9



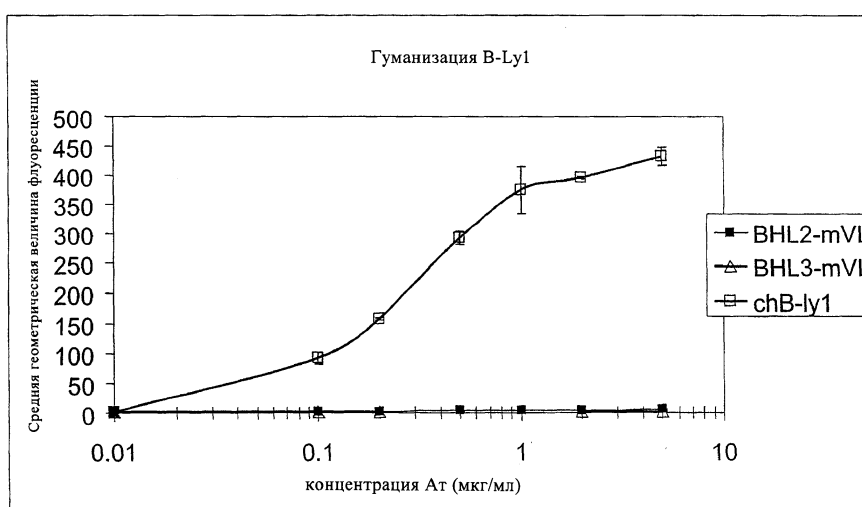
Фиг. 10



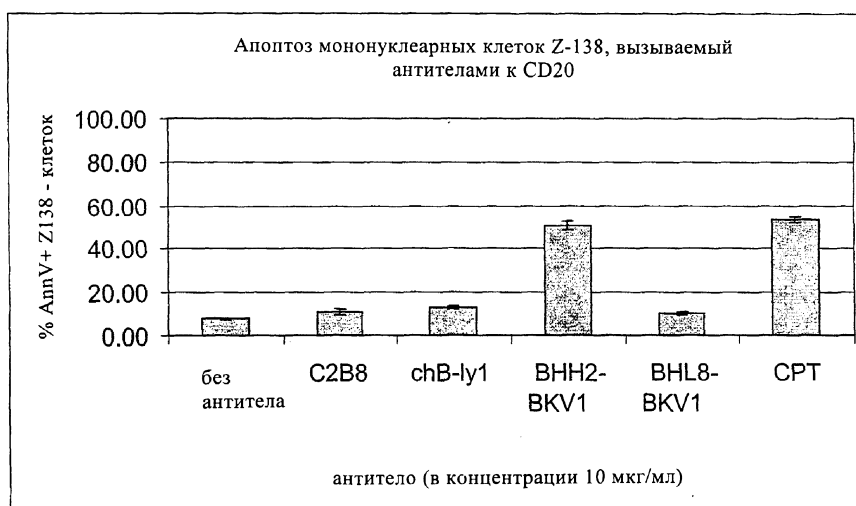
Фиг. 11



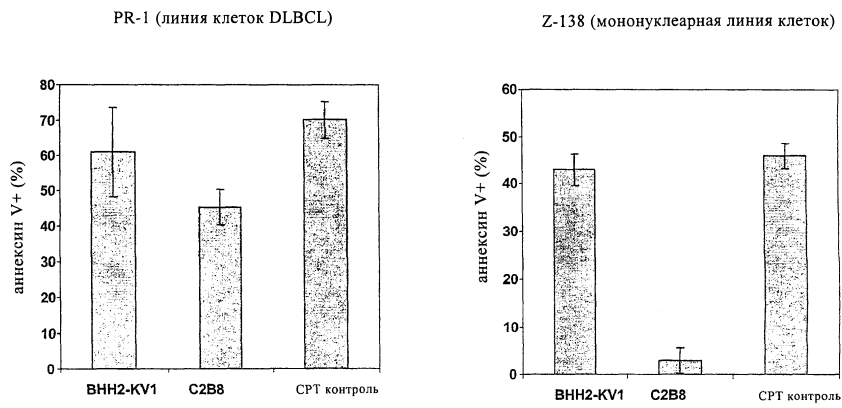
Фиг. 12



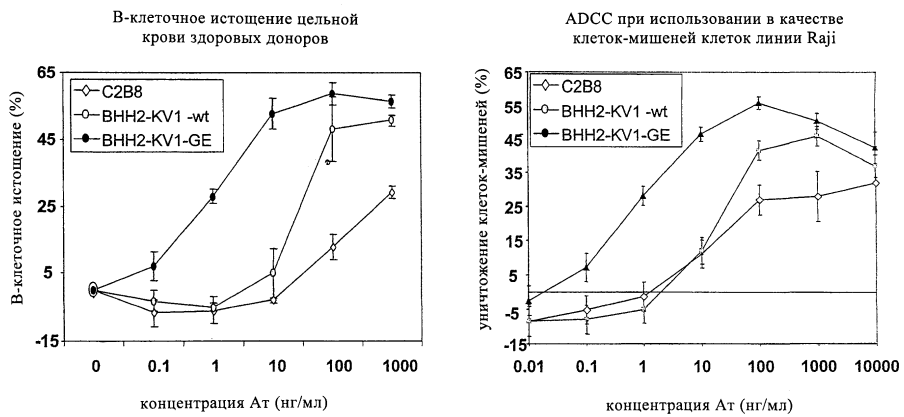
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

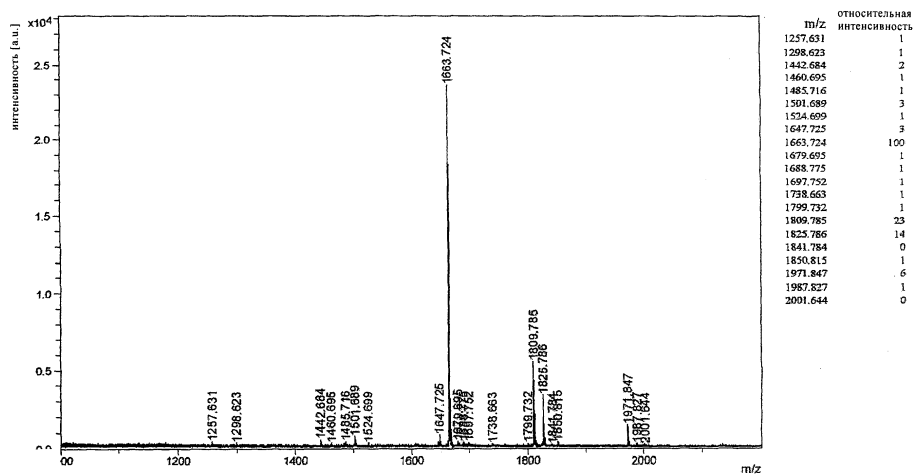


Фиг. 16

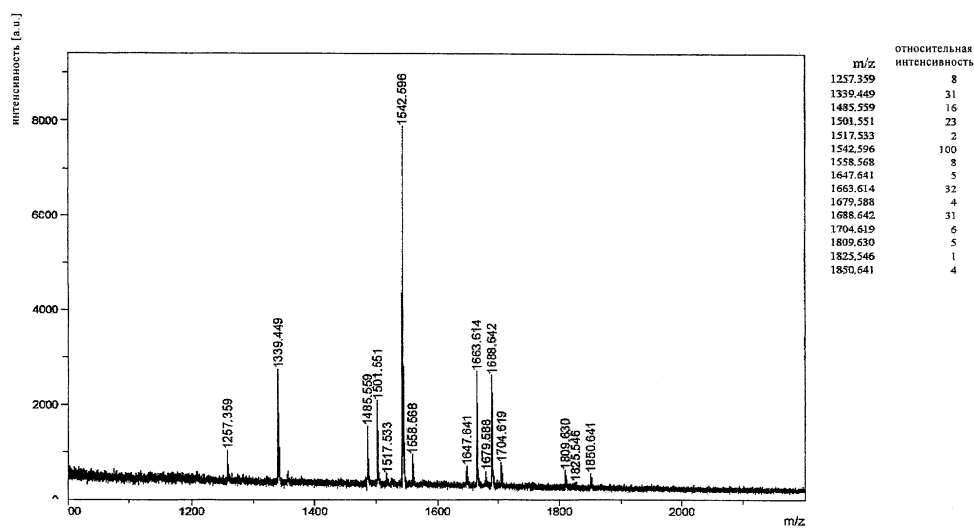


Фиг. 17

036531

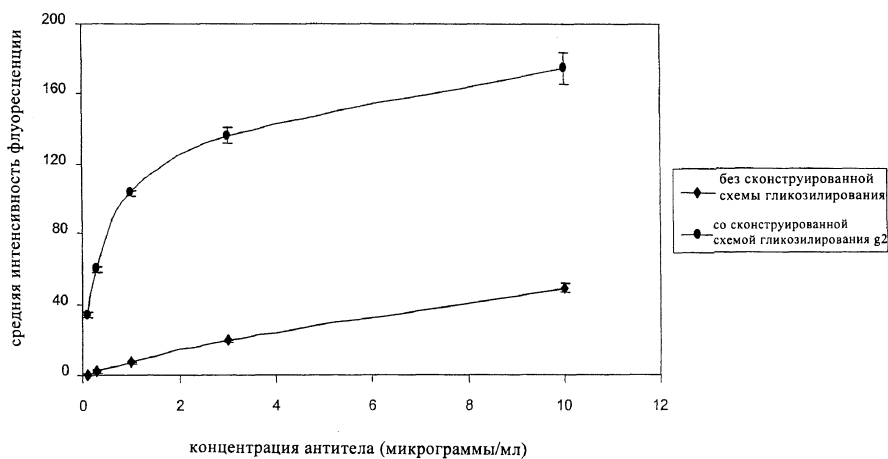


Фиг. 18



Фиг. 19

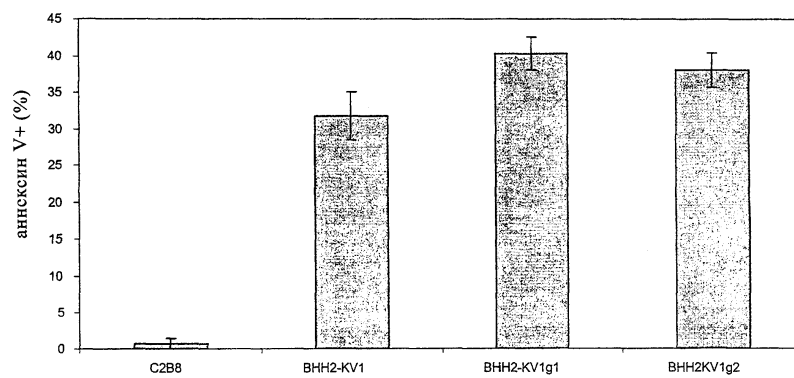
Связывание Ат с FcγRIII на поверхности CHO-CD16-клеток



Фиг. 20

Апоптоз, вызываемый антителами к CD20

линия клеток лимфомы клеток мантии Z-138



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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