

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 022780

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2016.03.31

(21) Номер заявки  
200870411

(22) Дата подачи заявки  
2007.04.03

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)  
C12P 21/08 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

---

(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И  
СНИЖЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА IgG

---

(31) 60/789,384

(32) 2006.04.05

(33) US

(43) 2009.04.28

(86) PCT/US2007/008396

(87) WO 2007/117505 2007.10.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ДЗЕ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ  
(US)

(72) Изобретатель:  
Равеч Джеффри В., Йосикатус Канеко,  
Ниммерьян Фальк (US)

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

(56) Weikert et al. Nature Biotechnology. November  
1999, vol 17, pages 1116-1121.  
US-20020164328

(57) Настоящее изобретение относится к препарату иммуноглобулина, содержащему по меньшей мере одну FC-область IgG, где указанный полипептид имеет более высокую противовоспалительную активность и более низкую цитотоксическую активность по сравнению с препаратом такого полипептида Ig без сиаловой кислоты.

022780

B1

022780

B1

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США под серийным № 60/789384, поданной 5 апреля 2005 г.

### Заявление относительно субсидированного федеральным правительством исследования

Исследование, приведшее к созданию настоящего изобретения, было частично поддержано грантом № AI 034662 Национальных Институтов Здоровья. Соответственно, Правительство США может иметь определенные права на данное изобретение.

### Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым способам конструирования терапевтических полипептидов для лечения воспалительных заболеваний.

### Предшествующий уровень техники

Хотя клеточные рецепторы иммуноглобулинов были впервые идентифицированы почти 40 лет тому назад, их центральная роль в иммунном ответе была выявлена лишь в последнее десятилетие. Они играют ключевую роль и в афферентной, и в эфферентной фазе иммунного ответа, устанавливая порог для активации В-клеток и продукции антител, регулирующих созревание дендритных клеток и соединяющих исключительную специфичность реакции антител с эффекторными путями, такими как фагоцитоз, обусловленная антителами клеточная цитотоксичность и вовлечение воспалительных клеток и их активация. Их центральная роль, заключающаяся в связывании гуморальной иммунной системы с природными эффекторными клетками, делает их привлекательными иммунотерапевтическими мишенями либо для усиления, либо для ограничения активности антител *in vivo*.

Взаимодействие антител и комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы влияет на разнообразные реакции, включая обусловленную антителами клеточно-зависимую цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), фагоцитоз, высвобождение воспалительных медиаторов, выведение антигена и период полужизни антител (обзоры см. в документах Daron, *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234 (1997); Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunol*, 2, 77-94 (1995); Ravetch and Kinet, *Annu Rev Immunol*, 9, 457-492 (1991)), каждый из которых включен в настоящий документ ввиду ссылки на них).

Константные домены антител непосредственно не участвуют в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела или иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются, соответственно,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ . Из различных классов иммуноглобулинов человека человеческие IgG1 и IgG3 опосредуют ADCC эффективнее, чем IgG2 и IgG4.

Переваривание антител папаином продуцирует два идентичных связывающих антиген фрагмента, называемых Fab-фрагментами, каждый из которых имеет один сайт связывания с антигеном и "Fc"-фрагментом, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fc-область является центральной для эффекторных функций антител. Была определена кристаллическая структура Fc-области человеческого IgG (Deisenhofer, *Biochemistry*, 20, 2361-2370 (1981), включено в настоящее описание в виде ссылки). В молекулах человеческого IgG Fc-область генерируется отщеплением под действием папаина по N-концевому Cys 226.

Длительное время считалось, что IgG опосредует и провоспалительную и противовоспалительную активность через взаимодействия, опосредованные его Fc-фрагментом. Таким образом, хотя взаимодействия Fc-Fc $\gamma$ R ответственны за провоспалительные свойства иммунных комплексов и цитотоксических антител, внутривенно вводимый гамма-глобулин (IVIg) и его Fc-фрагменты являются противовоспалительными и широко применяются для подавления воспалительных заболеваний. Точный механизм таких парадоксальных свойств неясен, но было высказано предположение, что гликозилирование IgG является решающим для регуляции цитотоксичности и воспалительного потенциала IgG.

IgG содержит одиночный N-связанный гликан у Asn<sup>297</sup> в CH2-доме на каждой из его двух тяжелых цепей. Ковалентно связанный сложный углеводород составлен из ядра, биантенарного пентаполисахарида, содержащего N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и маннозу (man). Дальнейшая модификация углеводородной структуры ядра наблюдается в сывороточных антителах с присутствием вариационно обнаруживаемых частей фукозы, разветвленного GlcNAc, галактозы (gal) и концевой сиаловой кислоты (sa). Таким образом было выявлено более 40 различных гликоформ, ковалентно прикрепленных к этому одиночному сайту гликозилирования (Fujii et al., *J. Biol. Chem* 265, 6009 (1990)). Было показано, что гликозилирование IgG существенно для связывания со всеми Fc $\gamma$ R путем поддержания открытой конформации двух тяжелых цепей. Jefferis and Lund, *Immune.1 Lett.* 82, 57 (2002), Sondermann et al., *J. Mol. Biol.* 309, 737 (2001). С этим абсолютным требованием гликозилирования IgG для связывания Fc $\gamma$ R связана неспособность дегликозилированных IgG-антител опосредовать запускаемые *in vivo* воспалительные реакции, такие как ADCC, фагоцитоз и высвобождение медиаторов воспаления (Nimmerjahn and Ravetch,

Immunity 24, 19 (2006)). На мысль о том, что отдельные гликоформы IgG могут участвовать в модулировании воспалительных реакций, навели дальнейшие наблюдения измененного сродства с отдельными FcγR, о котором сообщалось для IgG-антител, содержащих фукозу или лишенных ее, и их последовательных воздействиях на цитотоксичность Shields et al., J. Biol. Chem. 211, 26133 (2002), Nimmerjahn and Ravetch, Science 310, 1510 (2005). Связь между аутоиммунными состояниями и специфическими типами гликозилирования IgG-антител наблюдалась у пациентов с ревматоидным артритом и некоторыми аутоиммунными васкулитами, при которых сообщалось об уменьшенном галактозилировании и сиалилировании IgG-антител. Parekh et al., Nature 316, 452 (1985), Rademacher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6123 (1994), Matsumoto et al., 128, 621 (2000), Holland et al., Biochim. Biophys. Acta Dec 27; [Epub ahead of print] 2005. Сообщалось также, что изменения гликоформ IgG связаны со старением и после иммунизации, хотя значение этих изменений *in vivo* не было определено. Shikata et al., Glycoconj. J. 15, 683 (1998), Lastra, et al., Autoimmunity 28, 25 (1998). Соответственно, имеется потребность в разработке способов генерирования полипептидов, которые бы объясняли несопоставимые наблюдения свойств IgG *in vivo*.

#### **Краткое описание сущности изобретения**

Настоящее изобретение удовлетворяет указанную выше потребность, предоставляя такие способы и молекулы. В одном аспекте изобретение связано с полипептидом, содержащим по меньшей мере одну Fc-область IgG, причем указанный полипептид имеет более высокую противовоспалительную активность и более низкую цитотоксическую активность по сравнению с неочищенным антителом. В других вариантах осуществления изобретения полипептид включает Fc-область человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, причем указанный полипептид имеет более высокое содержание сиаловой кислоты по сравнению с неочищенным антителом.

В другом аспекте настоящее изобретение связано с фармацевтической композицией, включающей в себя полипептид, содержащий по меньшей мере одну Fc-область, имеющую более высокую противовоспалительную активность и более низкую цитотоксическую активность, в комбинации с подходящим носителем или разбавителем.

В еще одном аспекте изобретение связано со способом получения полипептида, содержащего по меньшей мере одну Fc-область, имеющую более высокую противовоспалительную активность и более низкую цитотоксическую активность, чем неочищенное антитело, причем способ включает в себя предоставление неочищенного источника полипептида, содержащего по меньшей мере одну Fc-область, причем неочищенный источник полипептида, содержащего по меньшей мере одну Fc-область, включающую множество полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, имеющую сиаловую кислоту, и множество полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, лишенную сиаловой кислоты; и увеличение отношения множества полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, имеющую сиаловую кислоту, ко множеству полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, лишенную сиаловой кислоты. В других вариантах осуществления изобретения отношение множества полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, имеющую сиаловую кислоту, к множеству полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, лишенную сиаловой кислоты, достигается или путем удаления полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG, лишенную сиаловой кислоты, или путем сиалилирования неочищенного источника полипептидов, содержащих по меньшей мере одну Fc-область IgG.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 приведены углеводородные спектры изотипов антитела 6A6-IgG. N-гликаны, полученные из 6A6-IgG1, IgG2a и IgG2b, анализировали методом MALDI-TOF MS (лазерная десорбционно/ионизационная масс-спектрометрия). Пики, содержащие остатки сиаловой кислоты, показаны скобкой. Варианты переключения рекомбинантного 6A6-антитела, продуцируемые транзитной трансфекцией клеток 293T, содержали минимальные уровни остатков сиаловой кислоты в их связанных с Asn-297 углеводородах.

На фиг. 2 показано, что сиалилирование снижает цитотоксичность IgG.

(А) Структура полностью обработанной углеводородной части, прикрепленной к аспарагину 297 (N297) в Fc-фрагменте антитела. Структура сахара ядра выделены жирными линиями. Варибельные остатки, такие как концевые и двурассекающие сахара, подчеркнуты, и показаны специфические связи. Также указаны участки расщепления для PNG-азы (N-гликозидазы) и нейраминидазы. Эта полностью обработанная структура присутствует примерно в 5% общего пула сывороточного IgG (1). Аббревиатуры: GlcNAc = N-ацетилглюкозамин, man = манноза, gal = галактоза, sa = сиаловая кислота.

(В) Обогащение 6A6-IgG1 и IgG2b антител высоким содержанием сиаловой кислоты посредством аффинной хроматографии агглютинина *Sambucus nigra* (SNA).

(С) Активность *in vivo* 6A6-IgG1 и IgG2b антител, обогащенных сиаловой кислотой (SA) или лишенных сиаловой кислоты обработкой нейраминидазой (NA). 4 мкг каждого антитела инъецировали группам мышей (N=4, средняя величина ± стандартная ошибка средней);

\*указывает  $p < 0,0001$ ,

\*\*указывает  $p < 0,01$ .

(D) Константа ассоциации ( $K_A$ ) для Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIH и Fc $\gamma$ RIV при связывании с антителами с высокими или низкими уровнями сиапирования; n.b. указывает на отсутствие связывания. Номера жирным шрифтом указывают изотип-специфические Fc-рецепторы. Которые ответственны за опосредование активности антител *in vivo*. Стандартная ошибка во всех этих измерениях была ниже 5%.

На фиг. 3 показано, что активность антител *in vivo* модулируется сиаловой кислотой. 6A6-IgG1 был обогащен сиаловой кислотой афинной хроматографией SNA-агарозой. Фракция этого обогащенного SNA препарата обрабатывалась нейраминидазой (обогащенной SNA + нейраминидазой).

(A) Содержание сиаловой кислоты в препаратах антител определяли блоттингом лектина SNA.

(B) Активность антител *in vivo* тестировали мониторингом истощения запаса тромбоцитов, вызванного инъекцией 4 мкг соответствующих препаратов антител (n=4-5 мышей на группу).

На фиг. 4 показано, что противовоспалительная активность IVIG (внутривенного препарата иммуноглобулина) требует сиаловой кислоты. (A) Клинические балльные оценки артрита, вызванного K/B $\times$ N сывороткой у мышей, получавших лечение PBS (фосфатно-буферным раствором), IVIG и IVIG, обработанным PNG-азой F (PNG-аза F IVIG). (B) В дополнение к лечению, показанному на фиг. 4 (A), мышей лечили IVIG, обработанным нейраминидазой (NA IVIG) или IVIG, обогащенным SNA (SNA IVIG).

(C) Клинические балльные оценки мышей, получавших лечение фрагментом Fc IVIG, обработанным нейраминидазой Fc (NA Fc), или обогащенным SNA Fc (SNA Fc) (N=4, средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней).

(D) Углеводородные профили препаратов IVIG. Показаны профили MALDI-TOF-MS N-гликанов, полученных из необработанных или обработанных нейраминидазой IVIG. Пики, которые содержат остатки сиаловой кислоты, показаны скобкой, а углеводородная композиция пиков представлена на фиг. 5.

(E) Репрезентативное окрашивание гематоксилином/эозином голеностопных суставов контрольных мышей или мышей с артритом, вызванным K/N, получавших лечение обогащенным SNA SNA IVIG (0,1 г/кг). Обширная нейтрофильная инфильтрация, наблюдавшаяся у мышей, получавших лечение K/N, отсутствует у мышей. Получавших лечение IVIG-SNA (0,1 г/кг).

(F) Пектиновый блоттинг контрольных фрагментов Fc IVIG, обработанных нейраминидазой Fc (NA Fc) и Fc с высоким содержанием сиаловой кислоты посредством афинной хроматографии агглютинаина *Sambucus nigra* (SNA) (SNA Fc).

(G) Анализ 2,3 и 2,6 связанных остатков сиаловой кислоты в IVIG. IVIG или оставляли необработанным (полоса 2), или обрабатывали нейраминидазой, специфичной для 2,3 связанных остатков сиаловой кислоты (полоса 3), или нейраминидазой, специфичной для 2,3 и 2,6 связанных остатков сиаловой кислоты (полоса 4). Удаление сиаловой кислоты анализировали блоттингом лектина SNA (который распознает 2,6 связанные остатки сиаловой кислоты) и MAL-I (который распознает 2,3 связанные остатки сиаловой кислоты). В качестве контроля для гликопротеида, обогащенного 2,3 связанными остатками сиаловой кислоты, использовали фетуин (полоса 1). Гель, окрашенный кумасси, служил в качестве контроля нагрузки (Coomassie).

(H) Противовоспалительная активность IVIG с истощением запасов 2,3 или 2,3 и 2,6 связанных остатков сиаловой кислоты. Мышам инъекцировали сыворотку KRN для индукции артрита и/или оставляли не лечеными (KRN), лечили IVIG (KRN + IVIG), IVIG с истощением запасов 2,3 связанных остатков сиаловой кислоты ( $\alpha$ 2-3 сиалидаза tx IVIG + KRN), или IVIG с истощением запасов 2,3 и 2,6 связанных остатков сиаловой кислоты ( $\alpha$ 2-3,6 сиалидаза tx IVIG + KRN). В качестве отрицательного контроля мышам инъекцировали PBS (без лечения).

Фиг. 5 иллюстрирует композицию углеводородных частей, высвобождаемых из N297 IgG Fc. Сахарная структура ядра, связанная с аспарагиновым остатком 297 в тяжелой цепи антитела, составлена из N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и маннозы (Man). Отдельные гликоформы варьируются в отношении прикрепления одной или двух концевых остатков галактозы (Gal), прикрепления концевых остатков сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминаминовой кислоты или Neu5Ac для человека и N-гликозилнейраминаминовой кислоты или Neu5Gc для мыши), и/или прикрепления двурасекающих GlcNAc или фукозы (Fuc). Цифры указывают молекулярную массу различных сахарных композиций, по данным определения MALDI-TOF MS. Массы гликановых структур указаны для человека и мыши (подчеркнутые).

На фиг. 6 показан период полураспада и целостность белка, лишенного сиаловой кислоты IVIG. (A) Уровень человеческого IgG в сыворотке мышей, получавших лечение IVIG, в указанные дни измеряли ELISA (N=4, средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней). Не было значимого различия периода полураспада IVIG и лишенного сиаловой кислоты IVIG. Значимость определяли повторным измерением с использованием дисперсионного анализа. (B) 10 мкг IVIG или лишенного сиаловой кислоты IVIG растворяли SDS-PAGE (электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) с использованием 8% полиакриламидного геля в не восстановленных условиях и визуализировали окрашиванием кумасси бриллиантовым синим. Обработка нейраминидаза не воздействовала на мономерную композицию и структурную целостность IVIG.

На фиг. 7 показан период полувыведения из сыворотки и состав подклассов обогащенного SNA IVIG. (A) Уровень человеческого IgG в сыворотке мышей, получавших лечение IVIG, в указанные дни

измеряли методом ELISA (N=4, средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней). Не было значимого различия периода полураспада IVIG и обогащенной SNA фракции IVIG. Значимость определяли повторным измерением с использованием дисперсионного анализа. (B) Подклассы IgG в необработанном и обогащенном SNA IVIG определяли ELISA. Различия не наблюдались.

На фиг. 8 показано, что сиаилированные белки с аналогичными углеводородными структурами не защищают мышей от артрита, вызванного сывороткой K/B $\times$ N. Эквивалентные молярные количества (6,7 мкмоль на кг) или равные массы (1 г на кг) IVIG или сиаобелков фетуина и трансферрина вводили за 1 ч до инъекции сыворотки K/B $\times$ N и клинические балльные оценки исследовали на 4-й день (N=4, средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней). PBS использовали в качестве дополнительного контроля. По сравнению с IgG, фетуин и трансферрин не имели статистически значимой противовоспалительной активности в эквивалентных молярных концентрациях. Значимость рассчитывали с учетом U-критерия Mann-Whitney.

На фиг. 9 показано, что противовоспалительная активность IVIG, обогащенного SNA, требует Fc $\gamma$ RIIB. (A) Не фракционированный IVIG (1 г/кг массы мыши), IVIG, обогащенный SNA (0,1 г/кг массы мыши), или PBS в качестве контроля инъецировали мышам с дефицитом Fc $\gamma$ RIIB за 1 ч до инъекции сыворотки K/B $\times$ N, и клинические балльные оценки исследовали на 4-й день (N=4, средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней). Не было значимых различий клинических балльных оценок артрита. Значимость рассчитывали с учетом U-критерия Mann-Whitney. (B) Накопление Fc $\gamma$ RIIB<sup>+</sup> моноцитов *in vivo* IVIG, обогащенным SNA. Мышам дикого типа инъецировали 1, 0,1 г/кг IVIG или 0,1 г/кг IVIG, обогащенного SNA, или PBS в качестве контроля. Брали клетки костного мозга (левый график) и селезенки (правый график) и анализировали проточной цитометрией через 1 день после инъекции (N=4). Клетки F4/80<sup>+</sup> Fc $\gamma$ RIIB<sup>+</sup> накапливались в значительной степени после лечения 1 г/кг IVIG или 0,1 г/кг IVIG, обогащенного SNA. Значимость различий рассчитывали t критерием Стьюдента.

На фиг. 10 показано, что активная иммунизация приводит к снижению сиаилирования IgG.

(A) Сывороточный IgG от нелеченных (преимунных) или мышей с нефротоксическим нефритом (NTN), вызванным иммунизацией бараньим IgG и нефротоксической сывороткой (NTS), характеризовали на содержание сиаловой кислоты блоттингом агглютинином *Sambucus nigra* (SNA) (см. способы).

(B) Количественное определение уровня сиаилирования общего количества сывороточных IgG и IgM антител и специфичных для бараньего IgG IgG антителу не леченых и NTN мышей (средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней), по данным определения денситометрией. В препаратах мышинных антител не присутствовал выявляемый IgG (данные не показаны).

(C) Анализ MALDI-TOF сахарных остатков, прикрепленных к IgG антителам от нелеченых и NTN мышей. Содержащие сиаловую кислоту части указаны скобкой. Детализованная углеводородная композиция отдельных пиков показана на фиг. 5.

(D) Выявление содержания сиаловой кислоты в антителах, осажденных в клубочках мышей, получавших инъекцию нефротоксической сыворотки с (NTS+CFA) и без (одна NTS) предварительной иммунизации бараньим IgG в полном адьюванте Фрейнда (CFA).

### Подробное описание изобретения

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что цитотоксическая и противовоспалительная реакция Fc-домена IgG возникает в результате дифференциального сиаилирования, связанного с Fc полисахарида ядра. Цитотоксичность IgG антител снижается после сиаилирования; напротив, противовоспалительная активность IVIG усиливается. Показано, что сиаилирование IgG регулируется после индукции антиген-специфического иммунного ответа, таким образом, предоставляя новое средство переключения IgG с природной, противовоспалительной молекулы в стационарном состоянии на адаптивный, провоспалительный вид после антигенной стимуляции.

Соответственно настоящее описание предоставляет преимущественную стратегию создания и отбора IgG с желаемым цитотоксическим и противовоспалительным потенциалом.

### Определения

В настоящем описании и формуле изобретения нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина соответствует индексу EU (единицах иммуноферментного анализа), как в документе Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), который специально включен в настоящий документ в виде ссылки. Термин "индекс EU как в документе Karat" относится к нумерации остатков человеческого IgG1 EU антитела.

Термин "нативные" или "родительские" относится к немодифицированным полипептидам, включающим аминокислотную последовательность FC. Родительские полипептиды могут включать FC-область с нативной последовательностью или FC-область с предсуществующими модификациями аминокислотной последовательности (такими как добавления, делеции и/или замещения).

Термин "полипептид" относится к любому фрагменту белка, содержащему по меньшей мере одну FC-область IgG, включая, без ограничения, полностью функциональные белки, такие, например, как антитела, например IgG-антитела.

Термин "FC-область" используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуногло-

булина. "FC-область" может представлять собой нативную FC-область или вариантную FC-область. Хотя границы FC-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, FC-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно ограничивается отрезком от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца.

"Домен CH2" FC-области человеческого IgG (также именуемый доменом "Cy2") обычно простирается примерно от аминокислоты 231 примерно до аминокислоты 340. Домен CH2 уникален в том, что он не является тесно спаренным с другим доменом. Скорее, N-связанные разветвленные углеводородные цепи вставлены между двумя доменами CH2 молекулы интактного нативного IgG. Предполагалось, что углеводород может обеспечить заместитель для междоменного спаривания и помочь стабилизировать домен CH2 (см. документ Burton, *Mol. Immunol*, 22, 161-206 (1985), который включен в настоящий документ ввиду ссылки на него).

"Домен CH3" включает отрезок остатков, расположенных ближе к С концу от домена CH2 в FC-области (т.е., от примерно аминокислотного остатка 341 до примерно аминокислотного остатка 447 IgG).

Термин «шарнирная область» в целом определяется как отрезок от Glu215 до Pro230 человеческого IgG1 (Sutton (1985)). Шарнирные области других подтипов IgG могут совмещаться с последовательностью IgG1 помещением первого и последнего цистеиновых остатков, образующих связи S-S между тяжелыми цепями, в одних и тех же положениях.

Термин "связывающий домен" относится к области полипептида, которая связывается с другой молекулой. В случае FcR связывающий домен может включать часть ее полипептидной цепи (например, ее  $\alpha$  цепи), которая ответственна за связывание FC-области. Один иллюстративный связывающий домен представляет собой внеклеточный домен цепи FcR.

"Функциональная FC-область" обладает, по меньшей мере, частичной "эффекторной функцией" нативной последовательности FC-области. Иллюстративные "эффекторные функции" включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание рецептора Fc; антитело-обусловленную клеточно-зависимую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавляющую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции в целом требуют комбинации FC-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела) и могут оцениваться с использованием различных анализов, как, например, раскрыто в настоящем описании.

"FC-область нативной последовательности" включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности FC-области, обнаруживаемой в природе. Как понятно среднему специалисту в данной области, "вариантная FC-область" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности нативной последовательности FC-области посредством по крайней мере одной "аминокислотной модификации". Предпочтительно вариантная FC-область имеет по меньшей мере одно аминокислотное замещение, по сравнению с FC-областью нативной последовательности или с FC-областью родительского полипептида, например, от примерно одного до примерно десяти аминокислотных замещений, и, предпочтительно, от примерно одного до примерно пяти аминокислотных замещений в FC-области нативной последовательности или в FC-области родительского полипептида. Вариантная FC-область в данном случае должна предпочтительно иметь по меньшей мере гомологию примерно 80% с FC-областью нативной последовательности и/или с FC-областью родительского полипептида, а предпочтительнее, по меньшей мере, гомологию примерно 90% с ними, предпочтительнее, по меньшей мере, гомологию примерно 95% с ними, еще предпочтительнее по меньшей мере гомологию примерно 99% с ними.

Термин "измененное гликозилирование" относится к полипептиду, как определено выше, нативному или модифицированному, в котором добавление углеводорода к константной области тяжелой цепи осуществляется или для увеличения, или уменьшения специфических сахарных компонентов. Например, в полипептидах, таких как, например, антитела, полученные в специфических линиях клеток, таких как например, Lec2 или Lec3, может быть недостаточное прикрепление сахарных частей, таких как фукоза и сialовая кислота.

Термины "рецептор Fc" или "FcR" используются для описания рецептора, который связывается с FC-областью антитела. В одном варианте осуществления изобретения FcR представляет собой человеческий FcR нативной последовательности. В другом варианте осуществления изобретения, FcR, включая человеческий FcR, связывает IgG антитело (гамма рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII, включая аллельные варианты и, альтернативно, формы, полученные в результате сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы Fc $\gamma$ RII включают Fc $\gamma$ RIIA и Fc $\gamma$ RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют одинаковые аминокислотные последовательности, которые отличаются в первую очередь их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc $\gamma$ RIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc $\gamma$ RIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) (см. обзор в документе Daron, *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234 (1997); обзор FcR представлен в документах Ravetch and Kinet, *Annu Rev Immunol*, 9, 457-92 (1991); Capel et al.,

Immunomethods, 4, 25-34 (1994); и de Haas et al., J Lab Clin Med, 126, 330-41 (1995), Nimmerjahn and Ravetch 2006, Ravetch Fc Receptors in Fundamental Immunology, ed William Paul 5<sup>th</sup> Ed., каждый из которых включен в настоящий документ ввиду ссылки на них).

"Антитело-обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность (ADCC)" и "ADCC" относятся к клеточно-зависимой реакции *in vitro* или *in vivo*, при которой цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcR (например, моноцитарные клетки, такие как естественные клетки-киллеры (NK) и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и в последующем вызывают лизис клетки-мишени. В принципе, любая эффекторная клетка с активирующим FcγR может запускаться для опосредования ADCC. Одна такая клетка, клетка NK, экспрессирует только FcγRIII, тогда как моноциты, в зависимости от их состояния активации, локализации или дифференциации, могут экспрессировать FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопозитических клетках резюмирована в документе Ravetch and Bolland, Annu Rev Immunol, (2001), который включен в настоящий документ ввиду ссылки на него.

"Человеческие эффекторные клетки" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют по меньшей мере один тип активирующего Fc рецептора, такой как, например, FcγRIII, и выполняют эффекторные функции ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты и нейтрофилы, причем предпочтительны PBMC и NK клетки. Эффекторные клетки можно выделить из их нативного источника, например, из крови или PBMC, как описано в настоящем документе.

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела (включая моноклональные антитела полной длины), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, пока они проявляют желаемую биологическую активность.

Фраза "содержание сиаловой кислоты" антитела относится и к общему количеству остатков сиаловой кислоты на FC-области тяжелой цепи антитела, и к отношению сиалилированных антител к асиалированным антителам в неочищенном препарате антитела, пока фраза содержится в контексте, ясно свидетельствующем о том, что подразумевается другое значение.

"Фрагменты антител", как определено с целью настоящего изобретения, включают часть интактного антитела, в целом включающего связывающую антиген или вариабельную область интактного антитела или FC-область антитела, которая сохраняет способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела; одноцепочечные молекулы антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты антител предпочтительно сохраняют по меньшей мере часть шарнирной и, необязательно, CH1 области тяжелой цепи IgG. Предпочтительнее, фрагменты антител сохраняют всю константную область тяжелой цепи IgG и включают легкую цепь IgG.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции, по существу, однородных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных естественно встречающихся мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, причем они направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на антигене. Модификатор "моноклональное" указывает на характер антитела как полученного из, по существу, однородной популяции антител, и его не следует рассматривать как требующее продукции антитела любым конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие использованию в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены способом гибридомы, впервые описанным в документе Kohler and Milstein, Nature, 256, 495-497 (1975), который включен в настоящий документ ввиду ссылки на него, или его можно получить способами рекомбинантной ДНК (см, например, патент США № 4816567, который включен в настоящий документ ввиду ссылки на него). Моноклональные антитела можно также выделить из библиотек антител фага с использованием методик, описанных, например, в документах Clackson et al., Nature, 352, 624-628 (1991) and Marks et al., J Mol Biol, 222, 581-597 (1991), каждый из которых включен в настоящий документ ввиду ссылки на него.

В других вариантах осуществления изобретения полипептид, содержащий по меньшей мере одну FC-область IgG, может сливаться с другими белковыми фрагментами, включая без ограничения целые белки. Среднему специалисту в данной области будет без сомнения понятно, что многие белки могут сливаться с полипептидом по настоящему изобретению, включая без ограничения другие иммуноглобулины, в частности иммуноглобулины, лишенные их соответствующих FC-областей. Альтернативно, другие биологически активные белки или их фрагменты могут сливаться с полипептидом по настоящему изобретению, как описано, например, в патенте США № 6660843, который включен в настоящий документ ввиду ссылки на него. Этот вариант осуществления имеет особое преимущество для доставки таких биологически активных белков или их фрагментов в клетки, экспрессирующие рецепторы Fc. Кроме того, можно использовать различные маркеры, такие как, например, метка GST (глутатион S-трансферазы)

или зеленый флюоресцентный белок, или GFP (гамма-фетопротейн).

В настоящем описании моноклональные антитела, в частности, включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида, или относящихся к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная цепь (цепи) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида, или относящихся к определенному классу или подклассу антител, а также фрагментах таких антител, пока они проявляют желательную биологическую активность (см. патент США № 4816567; Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA, 81, 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature, 312, 604-608 (1984); Takeda et al., Nature, 314 452-454 (1985); Международная патентная заявка № PCT/GB85/00392, причем каждый из этих документов включен в настоящий документ ввиду ссылки на него).

"Гуманизированные" формы не человеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента замещены остатками из гипервариабельной области не человеческого вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или не человекообразный примат, имеющими желательную специфичность, сродство и способность. В некоторых случаях, остатки Fv каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими не человеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не обнаруживаются в антителе-реципиенте или в донорском антителе. Эти модификации произведены для дополнительной специализации функции антитела. В целом, гуманизированное антитело должно включать, по существу, все из по меньшей мере одного или обычно двух, вариабельных доменов, в которых все или, по существу, все из гипервариабельных петель соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или, по существу, все из остатков FR представляют собой остатки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также включает по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно константной области человеческого иммуноглобулина. Дополнительные детали можно найти в документах Jones et al., Nature, 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332, 323-329 (1988); Presta, Curr Opin Struct Biol, 2, 593-596 (1992); патент США № 5225539, каждый из которых включен в настоящий документ ввиду ссылки на него.

Полипептиды, содержащие по меньшей мере одну FC-область IgG, включают полипептиды, в которых специфические аминокислотные замещения, добавления или делеции введены в родительскую последовательность посредством использования методик рекомбинантной ДНК для модификации генов, кодирующих константную область тяжелой цепи. Введение этих модификаций производится в соответствии с принятыми методиками молекулярной биологии, как описано в таких руководствах как Molecular Cloning (Sambrook and Russell, (2001)). Кроме того, полипептиды по меньшей мере с одной FC-областью, включают те полипептиды, которые были выбраны для содержания специфических углеводородных модификаций, полученных или экспрессией в линиях клеток, известных их специфичностью гликозилирования Jones et al., Nature, 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332, 323-329 (1988); Presta, Curr Opin Struct Biol, 2, 593-596 (1992); или обогащением или истощением специфических лектинов или ферментной обработкой (Hirabayashi et al., J Chromatogr B Anal Tech Biol Med Life Sci, 771, 67-87 (2002); Robertson and Kennedy, Bioseparation, 6, 1-15 (1996)). В данной области известно, что качество и степень гликозилирования антител будет отличаться в зависимости от типа клеток и используемых условий культивирования. Например, Patel et al., Biochem J, 285, 839-845 (1992) сообщили, что содержание сиаловой кислоты в связанных с антителом сахарных боковых цепях значительно отличается, если антитела получали в виде асцита, или в бессывороточной или содержащей сыворотку культуральной среде. Кроме того, Kunkel et al., Biotechnol Prog, 16, 462-470 (2000) показали, что использование различных биореакторов для роста клеток и количество растворенного кислорода в среде влияли на количество галактозы и сиаловой кислоты в связанных с антителом сахарных частях. Однако эти исследования не были направлены на изучение того, как варьирующиеся уровни остатков сиаловой кислоты влияют на активность антител in vivo.

#### **Системы экспрессии хозяина**

Полипептид по настоящему изобретению может быть экспрессирован в системе экспрессии хозяина, т.е., клетках-хозяевах, способных к N-связанному гликозилированию. Обычно, такие системы экспрессии хозяина могут включать системы экспрессии грибов, растений, позвоночных или беспозвоночных животных. В одном варианте осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такого как линия клеток яичника китайского хомячка (CHO), (например, CHO-K1; ATCC CCL-61), линия клеток зеленой мартышки (COS) (например, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)), мышьяная клетка (например, NS/O), линия клеток детеныша почки хомяка (BHK) (например, ATCC CRL-1632 или ATCC CCL-10), или клетка человека (например, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), или любая другая подходящая линия клеток, например, имеющаяся в общественных депозитариях, таких как Американская коллекция типовых культур, Rockville, Md. Кроме того, клетка-хозяин представляет собой



клетку линию клеток насекомых, такую как линия клеток *Lepidoptora*, например Sf9, линия клеток растений, линия клеток грибов, например, дрожжей, таких как, например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula* spp. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что в некоторых случаях может потребоваться модификация клеток-хозяев для обеспечения того, чтобы происходило N-связанное гликозилирование и созревание гликана, приводящее к получению сложного, биантенарного сахара, как обычно обнаруживается на домене Fc человеческого IgG (см., например, Hamilton, SR, et al. Science, 3131441 (2006); Li H. et al., Nature Biotechnology 24, 210 (2006); Wildt S. and Grengross, TU Nature Reviews Microbiology 3, 119 (2005).

### Терапевтические препаративные формы

Терапевтические препаративные формы, включающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одну FC-область IgG, можно получить для хранения смешиванием полипептидов по настоящему изобретению, имеющих желательную степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных препаративных форм или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как аммонийхлорид октадецилдиметилбензила; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фениловый, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); полипептид низкой молекулярной массы (менее чем примерно 10 остатков); 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 углеводороды, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, манит, трегалоза или сорбит; образующие соль противоионы, такие как кА натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белка); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> или полиэтиленгликоль (PEG).

Препаративные формы по настоящему изобретению могут также содержать более одного активного соединения, в зависимости от необходимости для подвергаемого лечению конкретного показания, предпочтительно, активные соединения, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие молекулы могут присутствовать в комбинации с количествами, которые эффективны для предполагаемых целей.

Активные ингредиенты могут также захватываться в полученные микрокапсулы, например методами коацервации или межфазной полимеризации, например, соответственно гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокпсулы) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в документе Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980).

В предпочтительных вариантах осуществления препаративные формы, подлежащие использованию для введения *in vivo*, являются стерильными. Препаративные формы по настоящему изобретению можно легко стерилизовать, например, фильтрацией через мембраны стерилизационной фильтрации.

Можно также получить препараты длительного высвобождения. Подходящие примеры препаратов длительного высвобождения включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих модифицированное антитело, причем матрицы представлены в виде профилированных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц длительного высвобождения включают полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), или поли(виниловый спирт)), полилактиды (см., например, патент США № 3773919), сополимеров L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, не разлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (инъекционные микросферы, составленные из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролидацетата), и поли-D(-)-3-гидроксимасляная кислота. Хотя полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота обеспечивают возможность высвобождения молекул в течение более 100 дней, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные антитела остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурироваться или агрегироваться в результате воздействия влаги при 37°C, приводя к потере биологической активности и возможному изменению иммуногенности. Для стабилизации могут быть разработаны рациональные стратегии, в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации представляет собой образование межмолекулярной связи S-S посредством тио-дисульфидного взаимного обмена, стабилизацию можно достичь модификацией сульфгидрильных остатков, лиофилизацией из кислотных растворов, регуляцией содержания влаги, использованием соответствующих добавок и разработкой специфичных полимерных матричных композиций.

### Создание сialiлированных полипептидов, содержащих по меньшей мере одну FC-область IgG

Полипептиды согласно изобретению могут быть дополнительно очищены или модифицированы, с тем, чтобы они имели повышенное количество сиаловой кислоты, по сравнению с немодифицированными и/или неочищенными антителами. Существуют множество способов достижения этой цели. В одном способе, источник неочищенных полипептидов, такой, например, как содержащие IgG плазматические фракции, из которых обычно очищают IVIG, пропускают через колонку с лектином, как известно, связывающим сиаловую кислоту. В одном варианте осуществления лектин выделяют из *Sambucus nigra*. Таким образом, сialiлированная фракция полипептидов, содержащих по меньшей мере одну FC-область IgG, будет удерживаться в колонке, в то время как асialiлированная фракция будет проходить через нее. Сialiлированную фракцию полипептидов, содержащую по меньшей мере одну FC-область IgG, можно элюировать другим промыванием при других условиях жесткости требований. Таким образом, можно получить препарат полипептида по настоящему изобретению, где содержание сиаловой кислоты увеличено, по сравнению с нормальным содержанием. Кроме того, можно использовать ферментную реакцию с сialiилтрансферазой и донора сиаловой кислоты, как описано, например, в заявке на патент США № 20060030521.

Подходящими не ограничивающими примерами ферментов сialiилтрансферазы, используемых в заявленных способах, являются ST3Gal III, который также именуется  $\alpha$ -(2,3)сialiилтрансферазу (EC 2.4.99.6) и  $\alpha$ -(2,6)сialiилтрансферазу (EC 2.4.99.1).  $\alpha$ -(2,3)сialiилтрансфераза катализирует перенос сиаловой кислоты на Gal гликозида Gal- $\beta$ -1, 3GlcNAc или Gal- $\beta$ -1,4GlcNAc (см., например, Wen et al., J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992); Van den Eijnden et al., J. Biol. Chem. 256: 3159 (1991)), и ответственен за сialiлирование связанных с аспарагином олигосахаридов в гликопептидах. Сиаловая кислота связана с Gal с образованием  $\alpha$ -связи между двумя сахарами. Связывание (сцепление) между сахарами происходит между положением 2 NeuAc и положением 3 Gal. Известно, что этот конкретный фермент может быть выделен из печени крыс (Weinstein et al., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982)), человеческой кДНК (Sasaki et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269: 1394-1401) и последовательностей геномной ДНК (Kitagawa et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938) для содействия получению этого фермента путем рекомбинантной экспрессии.

Активность  $\alpha$ -(2,6) сialiилтрансферазы приводит к получению 6-сialiлированных олигосахаридов, включая сialiлированную галактозу. Название " $\alpha$ -(2,6)сialiилтрансфераза" относится к семейству сialiилтрансфераз, прикрепляющих сиаловую кислоту к шестому атому акцепторного полисахарида. Различные формы  $\alpha$ -(2,6) сialiилтрансферазы можно выделить из различных тканей. Например, одну специфическую форму этого фермента, ST6Gal II, можно выделить из мозга и фетальных тканей (Krzewinski-Recchi et al., Eur. J. Biochem. 270, 950 (2003)).

Кроме того, среднему специалисту в данной области будет понятно, что можно манипулировать условиями клеточной культуры для изменения скорости сialiлирования. Например, для увеличения содержания сиаловой кислоты, скорость получения уменьшают, а осмоляльность в целом поддерживают в пределах нижней границы, подходящей для конкретной культивируемой клетки-хозяина. Осмоляльность в диапазоне примерно от 250 примерно до 450 мОсм целесообразно для повышенного содержания сиаловой кислоты. Эти и другие подходящие условия клеточной культуры описаны, например, в патенте США № 6656466. Patel et al., Biochem J, 285, 839-845 (1992) сообщали, что содержание сиаловой кислоты в связанных с антителом сахарных боковых цепях значительно отличается, если антитела получают в виде асцита или в бессывороточной или содержащей сыворотку культуральной среде. Кроме того, Kunkel et al., Biotechnol Prog, 16, 462-470 (2000) показали, что использование различных биореакторов для роста клеток и количество растворенного кислорода в среде влияли на количество галактозы и сиаловой кислоты в связанных с антителом сахарных фрагментах.

В другом варианте осуществления клетки-хозяева, такие, например, как иммортализованные клетки человеческой эмбриональной сетчатки могут быть модифицированы путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей сialiилтрансферазу, такую, например, как  $\alpha$ -2,3-сialiилтрансфераза или  $\alpha$ -2,6-сialiилтрансфераза, функционально связанной с промотором, таким, например, как промотор CMV (цитомегаловируса).  $\alpha$ -2,3-сialiилтрансфераза может представлять собой человеческую  $\alpha$ -2,3-сialiилтрансферазу, известную как SIAT4C или STZ (номер доступа в банке генов L23767), и описана, например, в заявке на патент США № 20050181359.

Нуклеиновая кислота, кодирующая сialiилтрансферазу, может быть введена в клетку-хозяин любым способом, известным рядовому специалисту в данной области. Подходящие способы введения последовательностей экзогенной нуклеиновой кислоты также описаны в документе Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>rd</sup> Edition), Cold Spring Harbor Press, NY, 2000. Эти способы включают в себя, без ограничения, методики физического переноса, такие, например, как микроинъекция или электропорация; трансфекции, такие, например, как трансфекции фосфата кальция; перенос путем слияния мембран с использованием, например, липосом; и вирусный перенос, такой, например, как перенос с использованием ДНК или ретровирусных векторов.

Полипептид, содержащий по меньшей мере одну FC-область IgG, можно извлечь из супернатанта

культуры и при желании можно подвергнуть одной или более стадиям очистки, такой, например, как ионообменная или аффинная хроматография. Подходящие способы очистки очевидны для рядового специалиста в данной области.

Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что различные комбинации способов сиаилирования, описанные выше, могут привести к получению полипептидов, содержащих по меньшей мере одну FC-область IgG с крайне высоким уровнем сиаилирования. Например, можно экспрессировать полипептид, содержащий по меньшей мере одну FC-область IgG в клетках-хозяевах, избыточно экспрессирующих сиаилтрансферазу, как описано выше, а затем дополнительно обогатить сиаилированную фракцию этих полипептидов, например, путем сиаилирования этих полипептидов в ферментативной реакции, с последующей аффинной хроматографией с использованием содержащих лектин колонок. Аналогичным образом, ферментативную реакцию с последующей аффинной хроматографией можно использовать для источника IVIG полипептидов, содержащих по меньшей мере одну FC-область IgG.

Для исследования степени гликозилирования на полипептидах, содержащих по меньшей мере одну FC-область IgG, эти полипептиды можно очищать и анализировать в SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Гликозилирование можно определить путем взаимодействия выделенных полипептидов с определенными лектинами, или, альтернативно, как должно быть понятно рядовому специалисту в данной области, можно использовать ВЭЖХ с последующей масс-спектрометрией для идентификации гликоформ (Wormald, MR et al., Biochem 36:1370 (1997)).

Для более детального описания настоящего изобретения ниже приведены несколько не ограничивающих иллюстративных примеров.

### Примеры

Пример 1. IVI6 с повышенным содержанием сиаловой кислоты проявляет сниженную цитотоксичность.

Для определения того, участвуют ли специфические гликоформы IgG в модуляции эффекторных функций антител, исследовали роль специфических, связанных с Asn<sup>297</sup> углеводов в опосредовании цитотоксичности определенных моноклональных антител IgG. Антитромбоцитарные антитела, полученные из гибридомы 6A6, экспрессировались либо в виде IgG1, либо в виде вариантов переключения 2a или 2b в 293 клетках, как ранее описано в документе Nimmerjahn et al., Immunity 23, 41 (2005), анализировали методом масс-спектрометрии для определения их специфической углеводной композиции и структуры (фиг. 1). Эти антитела содержат минимальные остатки сиаловой кислоты. Обогащение видов, содержащих сиаловую кислоту, путем аффинной хроматографии с лектином *Sambucus nigra* давало антитела, обогащенные по содержанию сиаловой кислоты в 60-80 раз (фиг. 2B и 3). Сравнение способности сиаилированных и асиаилированных антител 6A6-IgG1 и 2b опосредовать выведение тромбоцитов выявило обратную корреляцию между сиаилированием и активностью *in vivo*. Сиаилирование антител 6A6-IgG привело к снижению биологической активности на 40-80% (фиг. 2C и 3).

Для определения механизма такого уменьшения активности осуществляли метод резонанса поверхностного плазмона для каждого антитела FRcYR мыши и его родственного антигена.

Анализ резонанса поверхностного плазмона осуществляли, как описано в документе Nimmerjahn and Ravetch, Science 310, 1510 (2005). Вкратце, варианты антитела 6A6, содержащие высокие или низкие уровни остатков сиаловой кислоты в их сахарных боковых цепях, иммобилизовали на поверхности чипов датчика CMS. Растворимые Fcγ-рецепторы инъецировали в различных концентрациях через проточную кювету при комнатной температуре в текущем буфере HBS-EP (10 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20) при скорости потока 30 мл/мин. Растворимые Fc-рецепторы инъецировали в течение 3 мин и диссоциацию связанных молекул наблюдали в течение 7 мин. Фоновое связывание с контрольными проточными кюветами автоматически вычиталось. Контрольные эксперименты выполняли для исключения ограничений массового транспорта. Константы сродства получали из данных сенсограммы с использованием одновременной подгонки к фазам ассоциации и диссоциации и глобальную подгонку к всем кривым в наборе. Модель связывания 1:1 Langmuir близко соответствовали наблюдаемым данным сенсограммы и использовались во всех экспериментах.

5-10-кратное снижение сродства связывания наблюдалось для сиаилированных форм этих антител к их соответствующим активирующим FcγR, по сравнению с их асиаилированными аналогами, в то время как различия сродства связывания с антигеном не наблюдалось (фиг. 2D). Таким образом, сиаилирование структуры связанного с Asn гликана IgG привело к снижению сродства связывания с активирующими FcγR, которые ограничены подклассом, и, таким образом, к понижению их цитотоксичности.

Для определения общих положений наблюдения, что сиаилирование N-связанного гликана IgG было вовлечено в модулирование его воспалительной активности *in vivo*, заявители далее исследовали роль N-связанных гликанов на противовоспалительную активность IVIG. Эта очищенная фракция IgG, полученная из объединенной сыворотки 5-10000 доноров при введении в высоких дозах (1-2 г/кг), широко используется в терапевтических целях для лечения воспалительных заболеваний (Dwyer N. Engl. J. Med. 326, 107 (1992)). Эта противовоспалительная активность представляет собой свойство фрагмента Fc

и является защитной на мышинных моделях ИТР (иммунной тромбоцитопенической пурпуры,) RA (ревматоидного артрита) и нефротоксического нефрита Imbach et al., *Lancet* 1, 1228 (1981), Samuelsson et al., *Science* 291, 484 (2001), Bruhns et al., *Immunity* 18, 573 (2003), Kaneko et al., *J. Exp. Med.* 203, 789 (2006).

Был предложен общий механизм для этой противовоспалительной активности, включающий индукцию экспрессии ингибиторной молекулы FcγRIIB на поверхности эффекторных макрофагов, посредством этого повышая порог, требуемый для индукции реакций эффекторных клеток цитотоксических антител IgG или иммунных комплексов путем активации запуска FcγR (Nimmerjahn and Ravetch, *Immunity* 24, 19 (2006)).

Пример 2. Десилилирование IVIG снижает противовоспалительный эффект IVIG на модели артрита у мышей

#### Мыши.

Мышей C57BL/6 и NOD закупают у Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мышей FcγRIIB-/- генерировали в лаборатории заявителей и подвергали обратному скрещиванию в течение 12 поколений до фона C57BL/6. Трансгенные мыши KRN TCR на фоне C57BL/6 (K/B) были подарены D. Mathis and C. Benoist (Harvard Medical School, Boston, MA) и скрещивали с мышами NOD с получением мышей K/B×N. Во всех экспериментах использовали самок мышей в возрасте 8-19 недель и их содержали в виварии университета Rockefeller. Все эксперименты проводили в соответствии с федеральными законами и инструкциями учреждения, и они были одобрены университетом Rockefeller (New York, NY).

#### Антитела и растворимые Fc-рецепторы.

Варианты переключения антитела 6A6 были получены транзитной трансфекцией клеток 293T с последующей очисткой через белок G, как описано в документах Nimmerjahn et al., *Immunity* 23, 41 (2005) и Nimmerjahn and Ravetch, *Science* 310, 1510 (2005). Обогащенные сиаловой кислотой варианты антител были выделены из этих препаратов антител путем аффинной хроматографии с лектином и агглютинином *Sambucus nigra* (SNA) на агарозе (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Обогащение в отношении содержания сиаловой кислоты верифицировали блоттингом лектина (см. ниже). Человеческий иммунный глобулин для внутривенного введения (IVIG, 5% в 10% мальтозе, очищенный хроматографией) закупали у Octapharma (Hemdon, VA). Переваривание человеческого IVIG выполняли, как описано в документе Kaneko Y. et al., *Exp. Med.* 203, 789 (2006). Вкратце, IVIG переваривали 0,5 мг/мл папаина в течение 1 ч при 37°C и останавливали добавлением 2,5 мг/мл йодзетамиды. Полученные фрагменты Fab и Fc отделяли от не переваренного IVIG на колонке HiPerp 26/60 S-200HR (GE Healthcare, Piscataway NJ), с последующей очисткой фрагментов Fc и Fab колонкой Protein G (GE Healthcare) и колонкой Protein L (Pierce, Rockford, IL). Чистоту фрагментов проверяли иммуноблоттингом, используя Fab и Fc-специфические антитела против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Чистоту считали большей, чем 99%. Антитело F4/80 было от Serotec (Oxford, UK). Антитело Lγ 17.2 было от Caltag (Burlingame, CA). Баранья антисыворотка против основной мембраны клубочков (GBM) (нефротоксическая сыворотка, NTS) была даром от M.P. Madaio (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). Растворимые рецепторы Fc, содержащие C-концевую метку гекса-гистидина, генерировали транзитной трансфекцией клеток 283T и очищали из супернатантов клеточных культур агарозой Ni-NTA, как предлагается изготовителем (Qiagen).

IVIG обрабатывали нейраминидазой, и композицию и структуру полученного препарата анализировали масс спектрометрией. После обработки нейраминидазой, не осталось выявляемых гликанов, содержащих сиаловую кислоту (фиг. 4D, F и 5). Затем эти препараты IgG тестировали на их способность защищать мышей от воспаления суставов, вызванного пассивным переносом сыворотки K×N, модели воспалительного заболевания, опосредованного иммунным комплексом IgG 1. Десилилирование нейраминидазой аннулировало защитный эффект препарата IVIG на модели артрита, вызванного сывороткой K×N (фиг. 4B, C, E). Эта потеря активности не была результатом уменьшенного периода полураспада в сыворотке препаратов асиалилированного IgG (фиг. 6A) или результатом изменений мономерной композиции или структурной целостности IgG (фиг. 6B). Удаление всех гликанов PNG-азой оказывало аналогичный эффект и аннулировало защитный эффект IVIG in vivo (фиг. 4A). Селективное удаление 2,6 связей сиаловой кислоты не оказывало видимого эффекта (фиг. 4G, H).

Пример 3. Фракция IVIG, обогащенная по содержанию сиаловой кислоты уменьшает воспаление на мышинной модели артрита.

Получение IVIG с увеличенным содержанием сиаловой кислоты Поскольку, как оказалось, сиаловая кислота требуется для противовоспалительной активности IVIG, основанием требования высокой дозы (1 г/кг) для этой противовоспалительной активности могла быть ограничивающая концентрация сиалилированного Ugg в общем препарате IVIG. IVIG фракционировали на аффинной колонке, содержащей SNA-лектин, для получения молекул IgG, обогащенных гликановыми структурами, модифицированных сиаловой кислотой.

Эти обогащенные сиаловой кислотой фракции тестировали на наличие защитных эффектов на модели артрита, вызванного переносом сыворотки K×N, по сравнению с не фракционированным IVIG. 10-кратное усиление защиты наблюдалось для фракции, связывающей SNA, так что эквивалентная защита

была получена в дозе 0,1 г/кг IVIG, обогащенного SNA, по сравнению с 1 г/кг не фракционированного IVIG (фиг. 4B, C). Период полураспада в сыворотке и распределение подклассов IgG фракции, обогащенной SNA, было эквивалентным таковому не фракционированного IVIG (фиг. 7A, B). Эффект сиалилирования был специфичным к IgG; сиалилированные N-связанные гликопротеины, такие как фетунин или трансферрин с аналогичными биантенными, сложными углеводородными структурами не имели статистически значимой противовоспалительной активности при эквивалентных молярных концентрациях IgG (фиг. 8). Наконец, механизм защиты препарата сиалилированного IVIG был аналогичен нефракционированному IVIG в том, что он является зависимым от экспрессии Fc $\gamma$ RIIB и приводит к повышенной экспрессии этого ингибиторного рецептора на эффекторных макрофагах (фиг. 9).

Пример 4. Увеличенная противовоспалительная реакция IVIG с повышенным содержанием сиаловой кислоты опосредуется сиалилированием N-связанного гликана на Fc-домене

Поскольку поликлональный IgG в IVIG может также содержать на вариабельных доменах легкой цепи или тяжелой цепи O- и N-связанные гликаны, которые могут быть сиалилированы, то заявители подтвердили, что увеличение противовоспалительной активности обогащенного SNA препарата IgG происходило в результате увеличения сиалилирования сайта N-связанного гликозилирования на Fc. Фрагменты Fc генерировали из не фракционированного и фракционированного SNF IVIG и тестировали на их активность *in vivo*. Как наблюдалось для интактного IgG, у очищенных SNA фрагментов Fc был усиленный защитный эффект *in vivo*, по сравнению с фрагментами Fc, генерированными из не фракционированного IVIG (фиг. 4C). Напротив, фрагменты Fab не проявляли противовоспалительной активности в этом анализе *in vivo*. Таким образом, требование высокой дозы для противовоспалительной активности IVIG можно отнести на счет небольшого вклада сиалилированного IgG, присутствующего в общем препарате. Обогащение этих фракций хроматографией лектина, связывающего сиаловую кислоту, в последующем увеличило противовоспалительную активность.

Эти результаты при использовании пассивной иммунизации IgG антител указали на то, что способность IgG переключаться с провоспалительного на противовоспалительный вид находится под влиянием степени сиалилирования N-связанного гликана на домене Fc.

Пример 5. Увеличение противовоспалительной активности, опосредованное сиалилированием IgG, происходит во время активной иммунной реакции

Мышиная модель болезни Гудпасчура.

На этой модели мыши сначала сенсибилизируются бараньим IgG вместе с адьювантом и через 4 дня им проводят инъекцию бараньего препарата против мышинной основной клубочковой мембраны (нефротоксической сыворотки, NTS). Вкратце мышей предварительно иммунизировали внутрибрюшинно 200 мкг бараньего IgG (Serotec) в CFA с последующей внутривенной инъекцией 2,5 мкл сыворотки NTS на грамм массы тела через 4 дня. Кровь брали у не получавших лечения контрольных мышей через 4 дня после инъекции антисыворотки против GBM, и сывороточный IgG очищали аффинной хроматографией на колонке с Protein G (GE Healthcare, Prmston, NJ) и связанным с сефарозой бараньим IgG, генерированным ковалентным связыванием бараньего IgG на колонке активированной NHS сефарозы (GE Healthcare, Princeton, NJ).

Предварительная сенсибилизация с последующей обработкой NTS индуцирует мышинные IgG2b анти-бараньи IgG антитела (иммунизированные NTN) (Kaneke Y. Et al., *Exp. Med.*, 203:789 (2006)). Мышинные IgG2b антитела откладываются в клубочке вместе с NTS антителами и приводят к острой и быстротечной воспалительной реакции путем опосредованной IgG2b активации Fc $\gamma$ RIV на инфильтрирующих макрофагах. В отсутствие предварительной сенсибилизации, воспаление не наблюдается, указывая на то, что мышинные IgG2b анти-бараньи IgG антитела являются медиаторами воспалительной реакции.

Для определения того, связана ли активная иммунизация, приводящая к провоспалительному IgG, с изменением сиалилирования, сывороточный IgG и IgM от преимунных и иммунизированных NTS мышей характеризовали в отношении содержания сиаловой кислоты связыванием SNA лектином, фиг. 10A, B C). Общее сиалилирование IgG было снижено в среднем на 40% у иммунизированных мышей, по сравнению с не иммунизированными контролями. Этот эффект был специфичен для IgG; сиалилирование IgM было эквивалентно до и после иммунизации. Это различие сиалилирования было больше выражено, когда анализировали специфичную для барана фракцию IgG из мышинной сыворотки, проявляя снижение сиалилирования на 50-60%, по сравнению с преимунным IgG (фиг. 10B).

Эти результаты были подтверждены анализом MALDI-TOF-MS. Анализ моносахаридной композиции выполняли на приборе UCSD Glycotechnology Core Resource (San Diego, CA). Образцы гликопротеина денатурировали SDS и 2-меркаптоэтанолом и переваривали PNG-азой F. Высвободившиеся смешанные N-гликаны очищали ВЭЖХ в обращенной фазе и твердофазной экстракцией и затем метилировали обнаженные гидроксильные группы N-гликанов. Полученные дериватизированные сахарады снова очищали ВЭЖХ в обращенной фазе и подвергали MALDI-TOF-MS.

Анализ IgG до и после иммунизации подтвердил, что изменения структуры N-гликана были специфичными для концевых частей сиаловой кислоты (фиг. 10C). Ранее было показано, что мышинные IgG2b анти-бараньи антитела, которые откладывались в клубочках, ответственные за вовлечение несущих

Fc $\gamma$ RIV, инфильтрирующих макрофагов, проявляли сниженное содержание сиаловой кислоты, по сравнению с предварительно иммунизированными контролями (фиг. 10D).

Все патентные и непатентные публикации, приведенные в настоящем описании, включены в настоящий документ в степени, как если бы каждая из этих патентных и непатентных публикаций была полностью включена в настоящий документ ввиду ссылки на нее. Далее, хотя представленное в настоящем документе изобретение было описано со ссылкой на определенные примеры и варианты осуществления, следует понимать, что эти примеры и варианты осуществления просто иллюстрируют принципы и виды применения настоящего изобретения. Поэтому следует понимать, что многочисленные модификации можно внести в иллюстративные варианты осуществления, и что могут быть найдены другие технические решения без отхода от сущности и объема настоящего изобретения, как определено следующей формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения противовоспалительной активности и снижения цитотоксической активности препарата иммуноглобулинов (Ig), часть из которых включает Fc-область с концевой сиаловой кислотой, которая соединена с галактозной группой через  $\alpha$ -2,6-связь, а другая часть включает Fc-область без концевой сиаловой кислоты, соединенной с галактозной группой через  $\alpha$ -2,6-связь, включающий:

- (1) удаление из препарата Ig, содержащих Fc-область без сиаловой кислоты; или
- (2) увеличение части, которая содержит Fc-область с концевой сиаловой кислотой, путем добавления сиаловой кислоты с помощью фермента к части, содержащей Fc-область без концевой сиаловой кислоты.

2. Способ по п.1, где указанный препарат содержит антитело IgG человека.

3. Способ по п.1 или 2, где препарат получен с помощью экспрессирующего вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты в экспрессирующей системе, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты транслирована в антитело IgG.

4. Способ по п.3, где экспрессирующая система включает экспрессирующие системы модифицированных хозяев, способных к N-связанному гликозилированию, выбранные из группы, состоящей из экспрессирующих систем грибов, растений, позвоночных или беспозвоночных животных и любых их комбинаций.

5. Способ по п.1, где указанное удаление достигается физическими или химическими способами.

6. Способ по п.5, где указанное удаление достигается способом, выбранным из группы, состоящей из ВЭЖХ, лектиновой аффинной хроматографии, анионообменной хроматографии при высоком pH и любой их комбинации.

7. Способ по п.1, где указанный препарат является препаратом IVIG человека.

8. Способ по п.1, где фермент представляет собой  $\alpha$ -(2,6)сиалилтрансферазу.

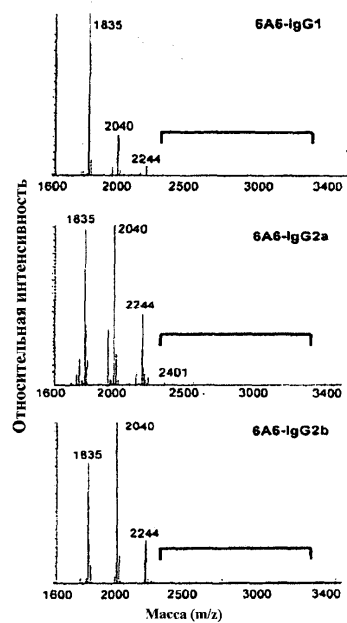
9. Способ по п.6, где указанное удаление достигается с помощью аффинной хроматографии с лектином, полученным из *Sambucus nigra* (SNA).

10. Способ получения противовоспалительной композиции, предусматривающий получение препарата Ig способом по любому из пп.1-9 и добавление фармацевтически приемлемого носителя.

11. Применение препарата Ig, полученного способом по любому из пп.1-9, для лечения воспалительного заболевания.

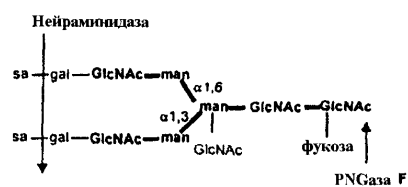
12. Применение композиции, полученной способом по п.10, для лечения воспалительного заболевания.

13. Применение по п.12, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из артрита, тромбоцитопении и нефрита.

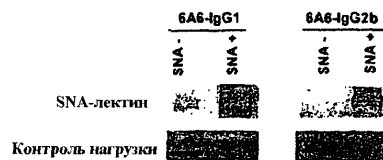


Фиг. 1

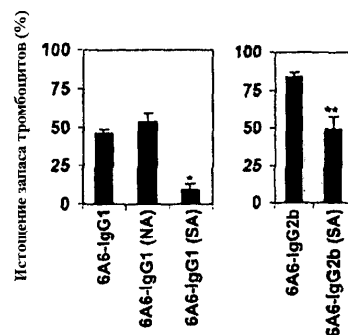
A



B



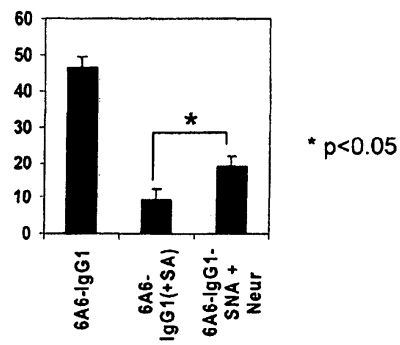
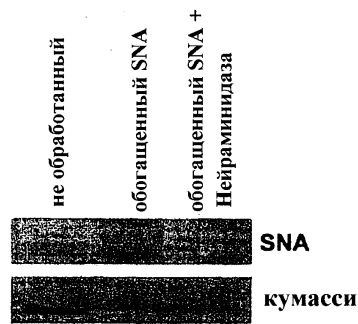
C



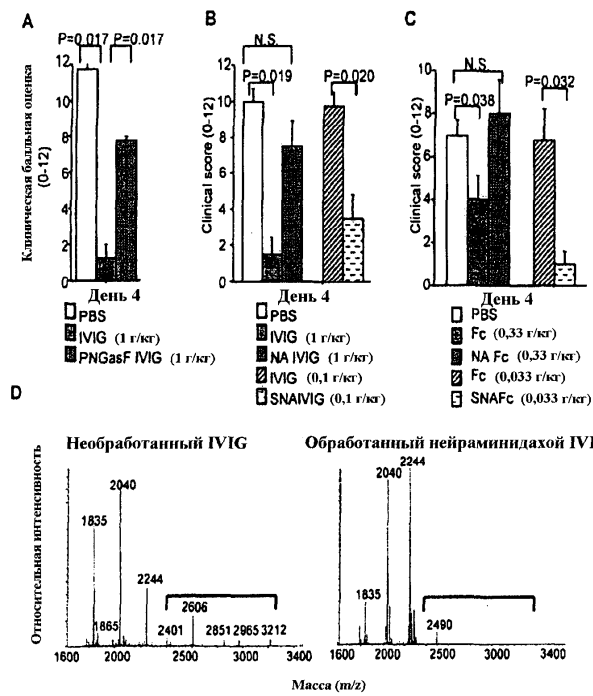
D

	FcγRIIB (K <sub>d</sub> )	FcγRIII (K <sub>d</sub> )	FcγRIV (K <sub>d</sub> )
6A6-IgG1	4.0x10 <sup>8</sup>	5.0x10 <sup>8</sup>	n.b
6A6-IgG1 SA	3.9x10 <sup>8</sup>	0.7x10 <sup>8</sup>	n.b
6A6-IgG2b	3.9x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>	2.9x10 <sup>7</sup>
6A6-IgG2b SA	2.6x10 <sup>8</sup>	0.5x10 <sup>8</sup>	3.3x10 <sup>6</sup>

Фиг. 2

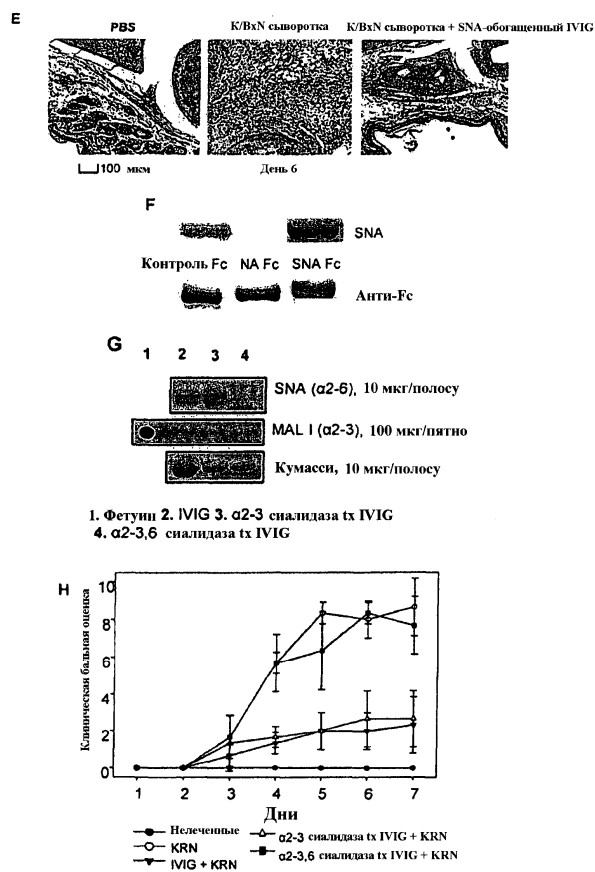


Фиг. 3



Фиг. 4

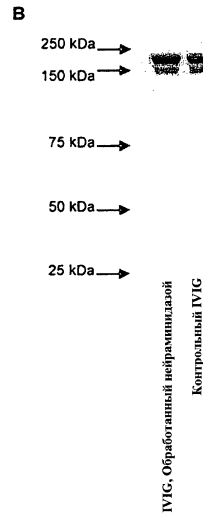
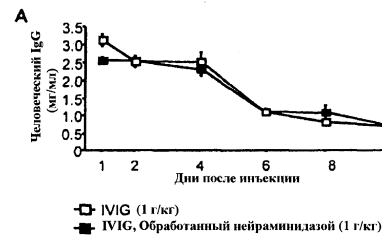




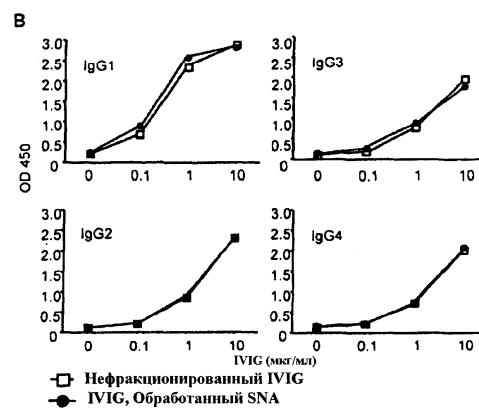
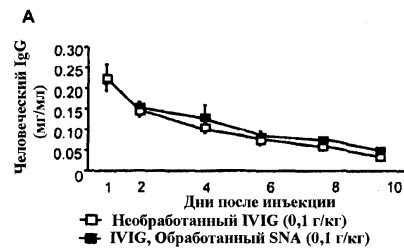
Фиг. 4 (продолжение)

Масса (m/z) (человеческая/мышинная)	Композиция
1835/1835	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
1865/1865	GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
2040/2040	GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2070/2070	Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
2244/2244	Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2401	Neu5AcGalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2432	Neu5GcGal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2490/2490	Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> (GlcNAc)GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2606	Neu5AcGal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2637	Neu5GcGal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2851	Neu5AcGal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> (GlcNAc)GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2882	Neu5GcGal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> (GlcNAc)GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
2965	Neu5Ac <sub>2</sub> Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
3028	Neu5Gc <sub>2</sub> Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
3212	Neu5Ac <sub>2</sub> Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> (GlcNAc)GlcNAc <sub>2</sub> Fuc
3275	Neu5Gc <sub>2</sub> Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> (GlcNAc)GlcNAc <sub>2</sub> Fuc

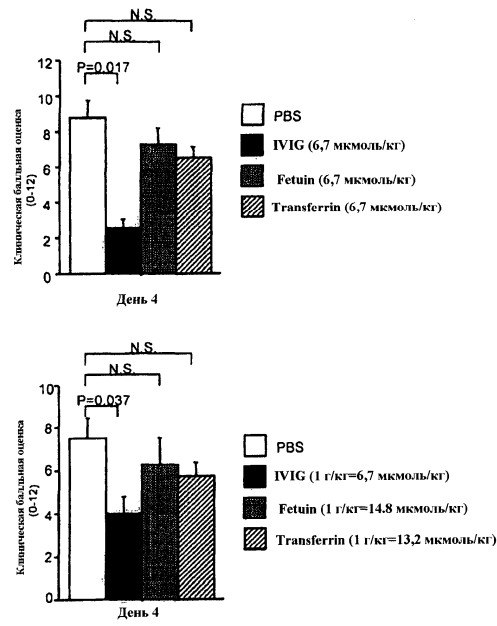
Фиг. 5



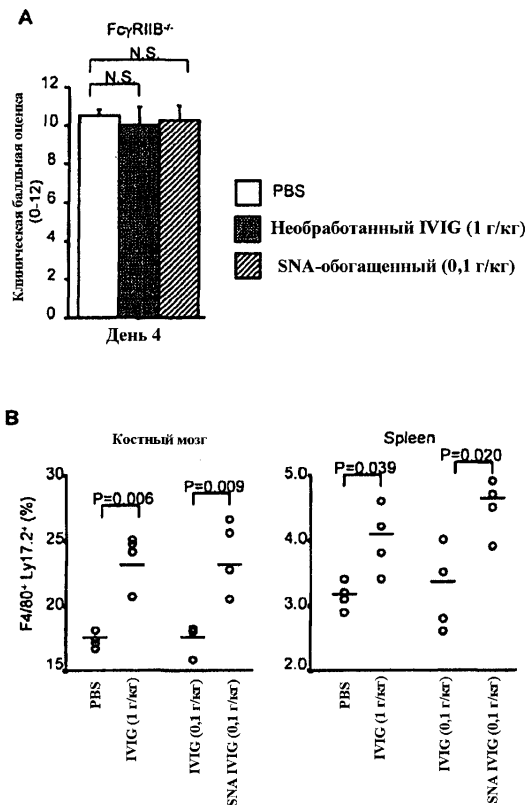
Фиг. 6



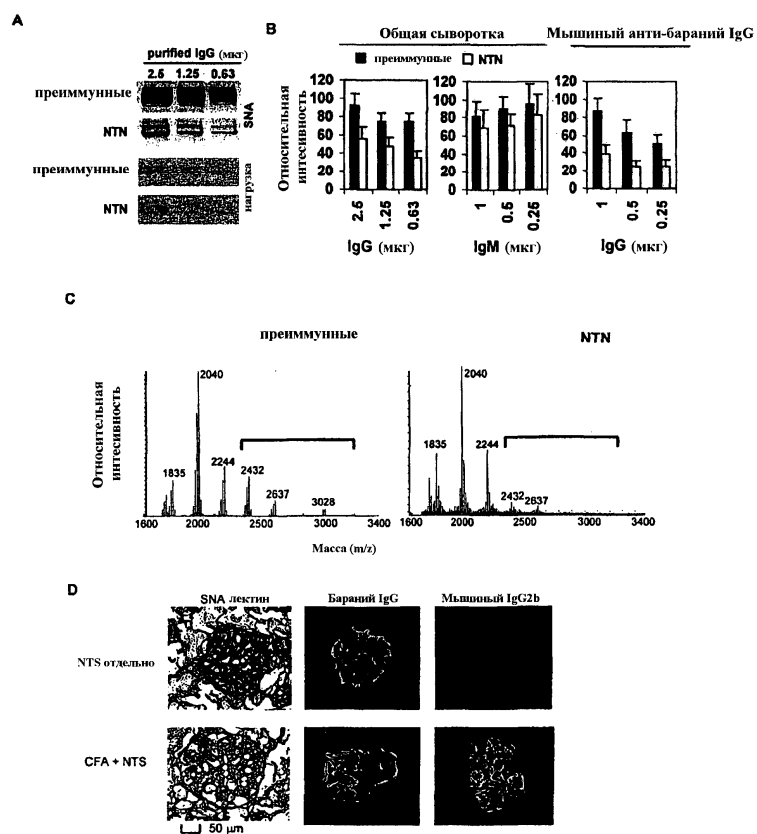
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

