



(19) RU (11) 2 226 196 (13) C2
(51) МПК⁷ C 07 K 16/00, A 61 K 47/48, A
61 P 37/00

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ
ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000131186/04 , 07.05.1999
(24) Дата начала действия патента: 07.05.1999
(30) Приоритет: 08.05.1998 GB 9809951.8
(46) Дата публикации: 27.03.2004
(56) Ссылки: SU 2129018 C1, 20.04.1999. WO 9805787 A, 12.02.1998. WO 9505468 A, 22.02.1995. WO 9428027 A, 08.12.1994.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 08.12.2000
(86) Заявка РСТ: GB 99/01441 (07.05.1999)
(87) Публикация РСТ: WO 99/58572 (18.11.1999)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: АРМОР Кэтрин Лесли (GB), КЛАРК Майкл Рональд (GB), УИЛЬЯМСОН Лорна МакЛеод (GB)
(73) Патентообладатель: КЕМБРИДЖ ЮНИВЕРСИТИ ТЕХНИКАЛ СЕРВИСИЗ ЛИМИТЕД (GB)
(74) Патентный поверенный: Лебедева Наталья Георгиевна

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ОТ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, КОТОРЫЕ НЕ СТИМУЛИРУЮТ ЛИЗИС, ОПОСРЕДОВАННЫЙ КОМПЛЕМЕНТОМ

(57)
Изобретение относится к группе новых соединений, являющихся связывающей молекулой, которая представляет собой рекомбинантное полипептидное антитело или адгезионную молекулу, включающую: (i) связывающий домен, способный связываться с молекулой-мишенью, и (ii) эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, в основном гомологичную всему константному домену тяжелой цепи иммуноглобулина человека или его части; где связывающая молекула способна связываться с молекулой-мишенью, не стимулируя при этом значительного комплементзависимого лизиса или клеточно-опосредованной деструкции мишени, и отличающаяся тем, что эффекторный домен обладает способностью специфически связываться с FcRn и/или Fc γ R11b и представляет собой химерный домен, который происходит от доменов C γ 2 тяжелой цепи двух или более

иммуноглобулинов человека, причем иммуноглобулины человека выбраны из IgG1, IgG2 и IgG4, и где химерный домен представляет собой домен C γ 2 тяжелой цепи иммуноглобулинов человека, который имеет следующие блоки аминокислот в заявленных положениях: 233P, 234V, 235A, 236G, 327G, 330S и 331S в соответствии с системой нумерации EU и может являться, по меньшей мере, на 98% идентичным последовательности C γ 2 (остатки 231-340) из IgG1, IgG2 человека, имеющих указанные модифицированные аминокислоты; а также к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую эффекторный домен связывающей молекулы; реплицируемому вирусу, содержащему эту аминокислоту; способу получения связывающей молекулы; способу связывания молекулы-мишени и фармацевтическому препарату, содержащему связывающую молекулу. 8 с. 16 з.п. ф-лы, 22 ил.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 226 196** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl. ⁷ **C 07 K 16/00, A 61 K 47/48, A 61 P 37/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000131186/04 ,
07.05.1999
(24) Effective date for property rights: 07.05.1999
(30) Priority: 08.05.1998 GB 9809951.8
(46) Date of publication: 27.03.2004
(85) Commencement of national phase: 08.12.2000
(86) PCT application:
GB 99/01441 (07.05.1999)
(87) PCT publication:
WO 99/58572 (18.11.1999)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25,
str.3, OOO "Juridicheskaja firma
Gorodisskij i Partnery", pat.pov.
N.G.Lebedevoy

(72) Inventor: ARMOR Kehtrin Lesli (GB),
KLARK Majkl Ronal'd (GB), UIL'JaMSON
Lorna MakLeod (GB)
(73) Proprietor:
KEMBRIDZh JuNIVERSITI TEKNIKAL
SERVISIZ LIMITED (GB)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **BINDING MOLECULES ORIGINATING FROM IMMUNOGLOBULINS THAT DO NOT STIMULATE
COMPLEMENT-MEDIATED LYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: recombinant proteins, immunology, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to group of new compounds that are binding molecules representing a recombinant polypeptide antibody or adhesion molecule comprising: (i) binding domain that is able to bind with a target-molecule; (ii) effector domain having amino acid sequence that is shows homology mainly with all constant domain of human immunoglobulin heavy chain or with its part wherein a binding molecule is able to bind with a target-molecule but without stimulation of significant complement-dependent lysis or cell-mediated destruction of target. Effector domain shows capacity to bind specifically with FcRn and/or FcγRIIb and represents chimeric domain that originates from domains C_H2 of heavy chain of two or more human immunoglobulins being human

immunoglobulins are taken among IgG1, IgG2 and IgG4 and wherein chimeric domain represents the domain C_H2 of human immunoglobulins heavy chain that comprises the following blocks of amino acids in the claimed positions: 233P, 234V, 235A and 236G, and 327G, 330S and 331A in accordance with the numeration system EU and can represent at least 98% of similarity with sequence C_H2 (residues 231-340) in human IgG1, IgG2 having indicated modified amino acids; and also to isolated nucleic acid comprising nucleotide sequence encoding effector domain of a binding molecule; to replicating virus comprising this nucleic acid; to method for preparing a binding molecule; to method for binding target-molecule and pharmaceutical preparation containing a binding molecule. EFFECT: valuable biological properties of molecules. 24 cl, 25 dwg

Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть).

Формула изобретения:

1. Связывающая молекула, которая представляет собой рекомбинантное полипептидное антитело или адгезионную молекулу, включающую (i) связывающий домен, способный связываться с молекулой-мишенью, и (ii) эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, в основном гомологичную всему константному домену тяжелой цепи иммуноглобулина человека или его части; где связывающая молекула способна связываться с молекулой-мишенью, не стимулируя при этом значительного комплементзависимого лизиса или клеточно-опосредованной деструкции мишени, отличающаяся тем, что эффекторный домен обладает способностью специфически связываться с Fc γ Rn и/или Fc γ RIIb и представляет собой химерный домен, который происходит от доменов C γ 2 тяжелой цепи двух или более иммуноглобулинов человека, причем иммуноглобулины человека выбраны из IgG1, IgG2 и IgG4, и где химерный домен представляет собой доменов C γ 2 тяжелой цепи иммуноглобулинов человека, который имеет следующие блоки аминокислот в заявленных положениях: 233P, 234V, 235A и 236G и 327G, 330S и 331S в соответствии с системой нумерации EU.

2. Связывающая молекула по п.1, в которой эффекторный домен выбран из G1 Δ ас или G4 Δ с, как показано на фиг.17, необязательно включающий дополнительные модификации для придания молекуле, по существу, нулевой аллотипии.

3. Связывающая молекула по п.2, в которой эффекторный домен выбран из G1 Δ ас или G4 Δ с, как показано на фиг.17.

4. Связывающая молекула, которая представляет собой рекомбинантное полипептидное антитело или адгезионную молекулу, включающую (i) связывающий домен, способный связываться с молекулой-мишенью, и (ii) эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, в основном гомологичную всему константному домену тяжелой цепи иммуноглобулина человека или его части; где связывающая молекула способна связываться с молекулой-мишенью, не стимулируя при этом значительного комплементзависимого лизиса или клеточно-опосредованной деструкции мишени, и отличающаяся тем, что эффекторный домен обладает способностью специфически связываться с Fc γ Rn и/или Fc γ RIIb и

представляет собой химерный домен, который происходит от доменов C γ 2 тяжелой цепи двух или более иммуноглобулинов человека, причем иммуноглобулины человека выбраны из IgG1, IgG2 и IgG4, и где химерный домен представляет собой домен C γ 2 тяжелой цепи иммуноглобулинов человека, который имеет следующие блоки аминокислот в заявленных положениях: 233P, 234V, 235A и в положении 236 аминокислота отсутствует, 327G, 330S и 331S в соответствии с системой нумерации EU, и является по меньшей мере на 98% идентичным последовательности C γ 2

(остатки 231-340) из IgG1 или IgG2 человека, имеющей указанные модифицированные аминокислоты.

5. Связывающая молекула по п.4, в которой эффекторный домен выбран из G1 Δ ab или G2 Δ a, как показано на фиг.17, необязательно включающий дополнительные модификации для придания молекуле, по существу, нулевой аллотипии.

6. Связывающая молекула по п.5, в которой эффекторный домен выбран из G1 Δ ab или G2 Δ a.

7. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, в которой эффекторный домен происходит от первого домена C γ 2 тяжелой цепи иммуноглобулина человека, в котором по меньшей мере 1 аминокислота по меньшей мере в 1 области домена C γ 2 была модифицирована в соответствующую аминокислоту из второго, отличного домена C γ 2 тяжелой цепи иммуноглобулина человека, и в котором эффекторный домен имеет сниженный аффинитет к Fc γ RI, Fc γ RIIa или Fc γ RIII и сниженную способность опосредовать комплемент-зависимый лизис по сравнению с первым или вторым доменом C γ 2 тяжелой цепи иммуноглобулина человека.

8. Связывающая молекула по п.7, где указанный эффекторный домен сохраняет аффинность по отношению к Fc γ RIIb.

9. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где указанный связывающий домен происходит от другого источника, отличающегося от источника эффекторного домена.

10. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где указанный связывающий домен способен связываться с любой из следующих молекул: с антигеном RhD эритроцитов; аллоантигеном HPA тромбоцитов; нейтрофильным антигеном; Т-клеточным рецептором; интегрином; коллагеном GMB; Der PI; HPA-1a; VAP-1; ламинином; лютераном; гликопротеином VI тромбоцитов; гликопротеином 1a/IIa тромбоцитов.

11. Связывающая молекула по п.10, где указанный связывающий домен выбирают из CAMPATH-1 и FOG1; OKT3; B2 (антитела против HPA-1a); VAP-1; мышиного антитела NC1 против α 3 (IV); YTH12,5 (CD3); 2C7 (антитела против Der p I); антитела против ламинина; антитела против лютерана.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую эффекторный домен связывающей молекулы по любому из предыдущих пунктов.

13. Нуклеиновая кислота по п.12, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует связывающую молекулу по любому из пп.1-11.

14. Реплицируемый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.12 или по 13.

15. Вектор по п.14, где указанная нуклеотидная последовательность операбельно связана с промотором.

16. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.14 или 15 или трансформированная этим вектором.

17. Способ получения связывающей молекулы по любому из пп.1-11, предусматривающий проведение стадии модификации нуклеотидной

последовательности, кодирующей первый домен C_H2 тяжелой цепи первого иммуноглобулина человека, так, чтобы 2, 3 или 4 аминокислоты, по крайней мере, в 1 области указанного домена C_H2 соответствовали аминокислоте из домена C_H2 тяжелой цепи второго иммуноглобулина человека, где указанные области выбирают из 2 дискретных областей, с остатками под номерами 233-236 и 327-331, пронумерованными в соответствии с системой нумерации EU, и где в каждом случае указанный иммуноглобулин человека выбирают из IgG1, IgG2 и IgG4.

18. Способ по п.17, где 2 аминокислоты в 1 области домена c_H2 модифицированы так, что они соответствуют аминокислотам домена c_H2 тяжелой цепи второго иммуноглобулина человека.

19. Способ связывания молекулы-мишени, где способ включает контактирование указанной молекулы-мишени со связывающей молекулой по любому из пп.1-11.

20. Способ по п.19, где молекулой-мишенью является Fc γ R11b, связывание с которой приводит к ингибированию одного или нескольких эффектов: активации В-клеток; дегрануляции тучных клеток; фагоцитоза.

21. Способ по п.19 для предупреждения, ингибирования или иного предотвращения каким-либо другим способом связывания второй связывающей молекулы с указанной молекулой-мишенью.

22. Способ по п.21, где второй связывающей молекулой является антитело.

23. Способ по п.21 или 22, где молекулу-мишень выбирают из антигена RhD эритроцитов; аллоантигена HPA тромбоцитов; нейтрофильного антигена; Т-клеточного рецептора; интегрина; коллагена GBM; Der PI; HPA-Ia; VAP-1; ламинина; лютерана; гликопротеина VI тромбоцитов; гликопротеина 1a/IIa тромбоцитов.

24. Способ по любому из пп.20-23 для лечения пациента от расстройств, выбранных из реакции "трансплантат против хозяина"; реакции "хозяин против трансплантата"; отторжения трансплантированного органа; отторжения трансплантированного костного мозга; аутоиммунных заболеваний, таких как васкулиты, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунная тромбоцитопения и артрит; аллоиммунных заболеваний, таких, как аллоиммунная тромбоцитопения плода/новорожденных; астмы и аллергии; хронических или острых воспалительных заболеваний, таких, как болезнь Крона; гемолитической болезни новорожденных; болезни Гудпасчера, серповидно-клеточной анемии, окклюзии коронарной артерии.

25. Способ по любому из пп.19-24, где связывающую молекулу вводят пациенту или необязательно в том случае, когда этим пациентом является неродившийся ребенок, матери этого ребенка.

26. Фармацевтический препарат, содержащий связывающую молекулу по любому из пп.1-12 или нуклеиновую кислоту по любому из пп.14-16, а также фармацевтически приемлемый носитель, применяемая при лечении заболеваний, указанных в п.24.

35

40

45

50

55

60

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к связывающим полипептидам, имеющим аминокислотные последовательности, происходящие от модифицированной константной области тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG). Настоящее изобретение также относится к способам и материалам для продуцирования таких полипептидов и к способам и материалам, в которых используются эти полипептиды.

Предшествующий уровень техники

Иммуноглобулины

Иммуноглобулины представляют собой гликопротеины, обеспечивающие защиту хозяина от инфекции. Они, в основном, состоят из тяжелых и легких цепей, N-концевые домены которых образуют вариабельный домен или V-домен, способный связываться с антигеном. V-домен ассоциируется с константным или C-концевым доменом, который определяет класс (а иногда подкласс [изотип], и аллотип [изоаллотип]) иммуноглобулина.

Так, например, у некоторых видов млекопитающих присутствуют такие иммуноглобулины, как IgD, IgG, IgA, IgM и IgE. Иммуноглобулины класса IgG, в свою очередь, присутствуют у человека в виде 4 подклассов (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). C-домен в IgG включает три домена C γ 1, C γ 2 и C γ 3, которые обладают очень большим сходством в пределах этих подклассов

(гомология превышает 90%). Домены C γ 1 и C γ 2 соединены шарнирной областью. Роль иммуноглобулина этого подкласса, очевидно, варьируется для каждого вида.

Известно, что С-домен ответственен за различные эффекторные функции иммуноглобулина (для подробного обзора см., Clark (1997) "IgG Effector Mechanisms" "Antybody Engineering" Ed. Capra, Pub. Chem. Immunol., Basel, Kurger, Vol. 65 pp 88-110.)

Вкратце, функции IgG, в основном, осуществляются посредством взаимодействия между Fc-областью Ig и Fc γ -рецептором (Fc γ R) или другой связывающей молекулой, иногда на эффекторной клетке. Это взаимодействие может стимулировать цитоллиз эффекторными клетками клеток-мишеней, с которыми связаны антитела посредством их вариабельных областей (V). Антитела, направленные против растворимых антигенов, могут также образовывать иммунные комплексы, которые направлены на Fc γ R, что приводит к поглощению (опсонизации) иммунных комплексов или к стимуляции эффекторных клеток и высвобождению цитокинов.

У человека были охарактеризованы три класса Fc γ R, хотя такая характеристика осложняется, дополнительно, тем, что у человека присутствует множество форм рецепторов. Этими тремя классами являются:

(i) Fc γ RI (CD64) связывается с мономерным IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, а иногда на нейтрофилах и эозинофилах.

(ii) FcγRII (CD32) связывается с комплексом IgG со средней или низкой аффинностью и экспрессируется на клетках широкого ряда. Эти рецепторы могут быть подразделены на два основных типа, FcγRIIa и FcγRIIb.

Форма "a" рецептора была обнаружена на многих клетках, участвующих в цитолизе (например, на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах) и, очевидно, способна активировать процесс цитолиза, и эта форма рецептора присутствует в виде двух альтернативных аллелей.

Форма "b", очевидно, играет определенную роль в процессах ингибирования и была обнаружена на В-клетках, макрофагах и на тучных клетках и эозинофилах. На В-клетках ее функция, очевидно, заключается в супрессии продуцирования других иммуноглобулинов и в переключении изотипов, например, класса IgE. На макрофагах форма b способствует ингибированию фагоцитоза, опосредованного FcγRIIa. На эозинофилах и тучных клетках форма b может способствовать супрессии активации этих клеток посредством связывания IgE с его отдельным рецептором.

(iii) FcγRIII (CD16) связывается с IgG со средней или низкой аффинностью и существует в двух типах. FcγRIIIa был обнаружен на клетках-киллерах, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках и опосредует ADCC. FcγRIIIb в высокой степени экспрессируется на нейтрофилах. Оба эти типа имеют разные аллотипические формы.

Также как и связывание с FcγR, антитела IgG могут активировать комплемент, и это может также приводить к лизису

клеток, опсонизации клеток или к высвобождению цитокинов и к воспалительной реакции. Fc-область также опосредует такие свойства, как транспорт IgG в организм новорожденного (посредством так называемого "FcRn"), увеличение периода полужизни (очевидно, опосредованное рецептором типа FcRn - см. Ghetie & Ward (1997) Immunology today 18, 592-598) и аутоагрегацию. Fc-область также ответственна за взаимодействие с белком А и белком G (указанное взаимодействие, очевидно, аналогично связыванию с FcRn).

Конструирование иммуноглобулинов

Многие из Fc-опосредованных свойств, обсуждаемых выше, могут оказаться желательными для природных или искусственно сконструированных антител. Однако, существуют ситуации, где, в частности, цитолиз клеток или высвобождение цитокинов и воспалительные реакции являются недопустимыми и нежелательными.

Однако, в равной степени, может оказаться желательным сохранить некоторые Fc-опосредуемые функции, например, продолжительный период полужизни в плазме.

Известно, например, что IgG4 человека не активирует комплемент, а IgG2 человека не связывается с высокой аффинностью с рецептором FcγR1, и эти свойства были ранее использованы в некоторых целях (был сконструирован гибридный белок TNF-рецептора с использованием Fc-области IgG4).

Однако, не существует подкласса иммуноглобулинов человека, у которых отсутствовали бы все соответствующие эффекторные стимулирующие Fc-функции, либо отсутствовала бы

активация комплемента при всех условиях, что обусловлено, вероятно, существованием нескольких форм FcγR. Так, например, у некоторых людей, IgG4 может стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), а IgG2 связывается с одной из аллельных форм рецептора FcγRIIa, а также активирует комплемент.

Альтернативным решением является мутация Fc-последовательности с заменой остатков, имеющих важное значение для ее функций. Некоторые целевые остатки были идентифицированы и опубликованы (см. выше, обзор Clark, 1997). Такими остатками являются N-связанный углевод, присоединенный к консервативной области в домене C_H2, некоторые остатки в нижней шарнирной области (например, в последовательности ELLGGP), пролиновый остаток в положении 331 и последовательность E-x-K-x-K в положениях 318-322. Один из примеров был недавно описан Cole et al., (1997), Journal of Immunol., 159, 3613-3621. В указанной работе остатки 234, 235 и 237 были заменены аланином (либо, в некоторых случаях, остаток 235 был заменен Glu). Однако, все эти остатки обычно не присутствуют в этих положениях IgG человека, а поэтому, присутствие таких аминокислот, не соответствующих природным аминокислотам, может сообщать Fc большую иммуногенность или антигенность и может также приводить к потере некоторых нужных Fc-функций.

Эта стратегия была также использована для конструирования терапевтического агликозилированного антитела CD3 (см, Routledge et al., 1993 Eur. J. Immunol. 23: 403-411; см. также заявку на патент Великобритании PA 9206422.9) и для

конструирования ингибирующего антитела CD18. Однако, здесь существует одна проблема, которая заключается в том, что эти новые рекомбинантные конструкции имеют несвойственные им последовательности и могут распознаваться и отвергаться иммунной системой как чужеродные. Агликозилированные антитела также не связываются с ингибирующим рецептором FcγRIIb, тогда как, в некоторых случаях, может оказаться преимущественным обеспечение такого связывания.

Другие методы модификации иммуноглобулинов описаны в WO 92/16562 (Lynxvale Ltd), где рассматривается модификация аллотипа "очеловеченного" антитела IgG1 CAMPATH1H, который обладает аффинностью связывания с антигеном CD52. Антиген CD52 был обнаружен на лимфоцитах и моноцитах человека и был использован в качестве терапевтической мишени для лечения Т- и В-клеточных лимфом и лейкоза, иммуносупрессии у реципиентов с трансплантированными органами и костным мозгом, а также для лечения некоторых аутоиммунных и других родственных им расстройств, таких как ревматоидный артрит и системный васкулит.

В WO 95/05468 (Lynxvale Ltd) также описана модификация аллотипических детерминант в Ig (или его производных), обладающих нужной способностью к связыванию или другими эффекторными функциями.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что получение нужных методов или материалов, которые должны облегчить конструирование Fc-областей, например, для снижения нежелательных эффектов при сохранении или улучшении

желательных свойств, должно внести существенный вклад в данную область науки.

Описание настоящего изобретения

Авторами настоящего изобретения были использованы новые комбинации последовательностей подкласса IgG человека для генерирования химерных полипептидов, содержащих неприродные последовательности Fc, имитирующие последовательности Fc человека, которые, тем не менее, не активируют комплемент или не стимулируют цитотоксическую активность посредством FcγR. При этом были сохранены некоторые нужные свойства IgG. Так, например, эти полипептиды не содержат "нечеловеческих" аминокислот, а поэтому, очевидно, обладают пониженной иммуногенностью. Кроме того, они связываются с белком A, что указывает на их способность проходить через плаценту человека посредством взаимодействия с FcRn (неонатальный Fc-рецептор).

Способ, посредством которого были сконструированы эти последовательности, и некоторые их проиллюстрированные свойства будут более подробно описаны ниже. Однако, при этом авторами настоящей заявки было сконструировано множество конструкций на основе трех различных последовательностей IgG (1, 2 и 4). Хотя соответствующие области этих антител имеют гомологию, они не имеют точного соответствия по длине, что, тем самым, осложняет процесс генерирования дериватизированных последовательностей, у которых были бы сохранены активности природных последовательностей. Сконструированные антитела сравнивали с родительскими контрольными антителами в отношении модельных антигенных систем RhD (Fog1) и CD52 (CAMPATH-1H).

Неожиданно было обнаружено, что у сконструированного ряда последовательностей имеется требуемая комбинация активностей, которая отсутствует у родительских молекул. Вообще говоря, они содержали 1 или более областей или блоков, которые имели модификацию (в основном, в 2, 3 или 4 аминокислотах), и которые, по своей конформации, соответствовали областям других подклассов. Особый интерес представляют две конкретных области или блока, а именно, 233-236 и 327, 330, 331.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения описана 'связывающая полипептидная молекула,' включающая в себя (i) связывающий домен, способный связываться с молекулой-мишенью, и (ii) эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, в основном, гомологичную всему константному домену тяжелой цепи иммуноглобулина человека или его части; и отличающаяся тем, что указанная связывающая молекула способна связываться с молекулой-мишенью, не стимулируя при этом значительного комплемент-зависимого лизиса или клеточно-опосредованной деструкции мишени; причем, предпочтительно, чтобы эффекторный домен был способен к специфическому связыванию с FcRn или FcγRIIb, а более предпочтительно, как с FcRn, так и с FcγRIIb.

Подтверждением специфического связывания FcRn может служить способность к специфическому связыванию с белком А.

Таким образом, связывающие молекулы настоящего изобретения обладают улучшенными клиническими свойствами (например, в случае "блокирующих" антител). Это может быть достигнуто путем получения эффекторного домена, происходящего

от Fc, который имеет пониженную аффинность по отношению к FcγRI, FcγRIIa и FcγRIII, но который сохраняет способность связываться с белком A (а поэтому и с FcRn и, следовательно, способствует неонатальному транспорту и длительному периоду полужизни) и/или FcγRIIb. Таким образом, в молекулах настоящего изобретения остатки, ответственные за связывание FcRn в IgG, не должны быть модифицированы в природной Fc-области.

Обычно, аффинность, которой обладает эффекторная область по отношению к рецептору FcγRI (по сравнению с одной Fc-областью, от которой она происходит), может быть снижена, в предпочтительных вариантах осуществления изобретения, в 100 раз или более. Для некоторых из рецепторов с низкой аффинностью, обсуждавшихся выше, аффинность может быть снижена, например, приблизительно, в 2-10 раз, хотя, в большинстве предпочтительных вариантов настоящего изобретения, она может быть даже снижена в 500 раз. Обычно, снижение соответствующей активности в хемилюминесцентном анализе (более подробно описанном ниже) может быть порядка вплоть до 30-300. Активность комплемента может снижаться примерно в 50 раз. Соответствующее значение для ADCC может быть гораздо выше, например в 10000 раз. Однако, каждому специалисту известно, что, при некоторых применениях, комбинация этих (пониженных) активностей может иметь определенные преимущества независимо от конкретного уровня их снижения.

Хотя ранее уже были получены химеры IgG1/IgG2 и IgG1/IgG4 (см., например, Morgan et al., (1995) Immunology 86: 319-324,

или Chappel et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 9036-9040, или Greenwood et al. (1993), Eur. J. Immunol., 23: 1098-1104), однако, было показано, что ни одна из них не имеет комбинации свойств, обладаемых связывающими молекулами настоящего изобретения.

Различные функции связывающей молекулы могут быть без труда оценены каждым специалистом, например, с использованием методов, описанных ниже, или методов, аналогичных этим методам. Так, например, связывающие свойства FcγR могут быть оценены прямыми или косвенными методами, например, путем определения неспособности стимулировать хемилюминесценцию моноцитов.

Более конкретно, неспособность к значительному стимулированию комплемент-зависимого лизиса (который, в основном, обусловлен пониженной аффинностью по отношению к молекуле Clq) может быть оценена по высвобождению CR-51 из клеток-мишеней в присутствии компонентов комплемента, например, в форме сыворотки (как описано ниже), в результате чего связывающая молекула вызывает менее, чем 5%, а предпочтительно, менее, чем 2% лизис специфических клеток-мишеней.

Аналогичным образом, клеточно-опосредованная деструкция мишени может быть оценена по высвобождению CR-51 из клеток-мишеней в присутствии соответствующих цитотоксических клеток, например, моноклеарных эффекторных клеток крови (как описано ниже), в результате чего связывающая молекула вызывает менее, чем 5%, а предпочтительно, менее, чем 2% лизис клеток-мишеней.

В способе, представляющем собой альтернативу прямому измерению, функциональные свойства могут быть оценены по их способности ингибировать эти характерные признаки функциональных иммуноглобулинов. Например, они могут быть оценены по обеспечению протективного действия в отношении комплемент-зависимого лизиса клеток или цитолиза клеток (например, ADCC), или по ингибированию ответа моноцитов на сенсibilизированные клетки.

В одном предпочтительном варианте этого аспекта настоящего изобретения эффекторный домен содержит аминокислотную последовательность, в основном, гомологичную последовательности C_H2, происходящей от IgG1, G2 или G4 человека, где указанная последовательность содержит одну или несколько модификаций (замены или делеции аминокислот) в соответствующих положениях, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU (см., Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest". Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH, 1991):

Положение	Аминокислота
233	P
234	V
235	A
236	(остаток отсутствует) или G
327	G
330	S
331	S

В предпочтительном варианте осуществления изобретения эти

замены осуществляют "в блоках" 233-236 и/или 327, 330, 331. Таким образом, мутированная область в домене C_H2 будет на 100% гомологична подклассу, от которого произошли эти замененные остатки, что приводит к снижению вероятности того, что эта область будет представлять В-клеточный или Т-клеточный эпитоп иммунной системе.

Было получено несколько мутантных иммуноглобулинов на основе IgG1, IgG2 или IgG4, имеющих установленные отличительные признаки, и было показано, что они обладают требуемыми свойствами. Хотя в ранее описанных связывающих молекулах были уже введены мутации в некоторые отдельные остатки, однако, указанные конкретные комбинации являются новыми, поскольку они имеют нужные функциональные свойства.

Предпочтительные формы связывающей молекулы более подробно обсуждаются ниже:

Эффекторный домен

Пептид включает эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, в основном, гомологичную всей или части константной области иммуноглобулина человека, предпочтительно, C-домен IgG.

Многие последовательности для C-областей иммуноглобулина человека были опубликованы, например, в обзоре Clark, (1997), см., выше. Другие последовательности для тяжелых цепей иммуноглобулина человека могут быть получены из базы данных SwissProt и PIR с использованием программного обеспечения Lasergene (DNASTar Limited, London UK) под номерами доступа A93433, B90563, A90564, B91668, A91723 и A02146 для C-области

цепи Igy-1 человека, A93906, A92809, A90752, A93132, A02148 для С-области цепи Igy-2 человека, A90933, A90249, A02150 для С-области цепи Igy-4 человека, и A23511 для С-области цепи Igy-3 человека.

Гомология (или идентичность, или сходство) может быть оценена любым стандартным методом. Гомология может быть на уровне кодирующей нуклеотидной последовательности или кодируемой аминокислотной последовательности. Термин "в основном, гомологичный" означает, что рассматриваемая аминокислотная последовательность имеет, по крайней мере, приблизительно 50%-, или 60%-, или 70%-, или 80%-ную гомологию, а наиболее предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 90%-, 95%-, 96%-, 97%-, 98%- или 99%-ную гомологию по отношению к сравниваемому иммуноглобулину.

Сходство или гомология могут быть оценены или определены с использованием программы TBLASTN, Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-10, которая обычно используется специалистами, либо может оказаться предпочтительней использовать стандартную программу BestFit, которая является частью Wisconsin Package, Version 8, September 1994 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711). Программа BestFit позволяет проводить оптимальное сравнение первичных последовательностей наиболее сходных сегментов двух последовательностей. Оптимальное сравнение первичных последовательностей проводят путем введения "брешей" для максимизации ряда соответствий с использованием алгоритма локальной гомологии Smith и Waterman.

Эта оценка в сочетании с оценкой требуемой комбинации активностей может быть без труда проведена каждым средним специалистом для выявления молекулы настоящего изобретения.

Помимо пониженной аффинности для FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb, может оказаться предпочтительным, чтобы эффекторная молекула сохраняла способность связываться с "ингибирующим" рецептором FcγRIIb, либо чтобы она, до некоторой степени, обладала этой способностью, а предпочтительно, чтобы ее аффинность связывания с этим рецептором была выше, чем аффинность для рецептора FcγRIIa, а более предпочтительно, чтобы ее аффинность совпадала с аффинностью домена родительского Ig, от которого она произошла. Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, показали, что связывающие молекулы, разработанные заявителями, обладают этим свойством. До настоящего времени нигде не указывалось, что связывание Fc-областей с FcγRIIa и FcγRIIb может быть модифицировано независимо друг от друга. Эта способность может дополнять другие нужные функции (определяемые по способности связываться с белком А) с увеличением терапевтического потенциала связывающей молекулы.

В частности, в ряде публикаций подчеркивалась важная роль, которую может играть FcγRIIb в ингибировании клеточных процессов (см, Daeron et al., 1995 Immunity 3(5): 635-46; Van den Herik et al., 1995 Blood 85(8): 2201-11; Sarmay et al., 1996 Immunol. Lett. 54(2-3): 93-100; Fong et al., 1996 Immunol. Lett. 54(2-3): 83-91; Sarmay et al., 1996, J. Biol.

Chem. 271(48): 30499-504; Unkeless & Jin, 1997 Curr. Opin. Immunol. 9(3): 338-43; Isakov, 1997 Immunol. Res. 16(1): 85-100; Hunter et al., 1998 Blood 91(5): 1762-8; Malbec et al., 1998 J. Immunol 160(4): 1647-58; Clynes et al., 1999 J. Exp. Med. 189(1): 179-85). Этими сотрудниками было обнаружено, что FcγRIIb, при его перекрестном связывании с другими рецепторами, может ингибировать передачу сигнала от этих рецепторов, что приводит, тем самым, к ингибированию таких процессов, как активация В-клеток, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, осуществляемый макрофагами.

Таким образом, связывающие молекулы настоящего изобретения, которые сохраняют эту активность, могут быть использованы не только для конкурентного связывания и конкурентного ингибирования нежелательных взаимодействий антитело-антиген (такой как аутоантиген или аллоантиген), но также и для неконкурентного ингибирования этих процессов, например, путем предотвращения дальнейшего продуцирования аутоантител или аллоантител посредством ингибирования активации В-клеток. Другой пример применения этого ингибирующего действия описан ниже в связи с обсуждением терапевтических средств против аллергии и астмы (ингибирование дегрануляции тучных клеток) и анти-RhD молекул (ингибирование фагоцитоза).

Предпочтительно, чтобы эффекторный домен по своей природе происходил от константной области иммуноглобулина человека, а более предпочтительно, от С-домена IgG.

Предпочтительно, чтобы рассматриваемая аминокислотная

последовательность была, в основном, гомологична последовательности C_H2 (т.е., приблизительно, в остатках 231-340), происходящей от IgG1, IgG2 или IgG4 человека и имеющей модифицированные аминокислоты, описанные выше.

Наиболее предпочтительные последовательности C_H2 показаны на Фиг. 17, а в частности, последовательности, обозначенные G1Δab, G2Δa, G1Δac, соответственно.

Любая из этих последовательностей может быть объединена (например, быть смежной) с природной или модифицированной C_H3 и природной или модифицированной шарнирной областью, и, необязательно с последовательностями C_H1 в молекулах настоящего изобретения.

Однако, каждому специалисту следует учесть, что необязательно, чтобы другие части эффекторного домена (или другие домены молекулы) содержали природные последовательности - а в частности, может оказаться желательным объединение описанных здесь модификаций последовательностей с другими модификациями, например, выбранными из литературных источников, но лишь при условии, что будут сохранены требуемые активности. Каждому специалисту следует учесть, что связывающие молекулы, содержащие такие дополнительно модифицированные (например, путем добавления, инсерции, делеции или замены аминокислот) эффекторные домены, входят в объем настоящего изобретения.

Особенно предпочтительными могут быть последовательности "нулевого аллотипа", такие как последовательности, происходящие от тяжелой цепи IgG (см. WO 92/16562), где

аллотипические остатки модифицированы, чтобы они соответствовали остаткам, присутствующим в других молекулах подкласса IgG человека. Это может минимизировать число последовательностей, распознаваемых любым индивидуумом как чужеродные.

Связывающий домен и молекула-мишень

Пептидная молекула содержит связывающий домен, способный связываться с молекулой-мишенью.

Связывающий домен будет обладать способностью к взаимодействию с молекулой-мишенью, которая является, предпочтительно, другим полипептидом, но может быть любой другой молекулой-мишенью (например, углеводом, липидом (таким как фосфолипид) или нуклеиновой кислотой). Предпочтительным является специфическое взаимодействие. Связывающий домен может происходить из того же источника, что и эффекторный домен, или из другого источника.

Так, например, эффекторный домен, в основном, происходит от антитела, а связывающий домен может происходить от любой молекулы, обладающей специфичностью по отношению к другой молекуле, например, к ферменту, гормону, рецептору (связанному с клеткой или циркулирующему в кровотоке), цитокину или антигену (который специфически связывается с антителом).

Предпочтительно, эта молекула составляет все антитело или часть антитела или его производное, а в частности, природный или модифицированный вариабельный домен антитела. Таким образом, связывающая молекула настоящего изобретения может представлять собой связывающий домен антитела, происходящего

от грызунов или верблюдовых (*camelidae*) (см. WO 94/25591), и тяжелую цепь иммуноглобулина человека, описанные выше.

Предпочтительными также могут быть молекулы, имеющие связывающий домен более, чем одного типа, такие как биспецифические антитела (см. например, PCT/US92/09965). В этих случаях одно "плечо" связывается с клеткой-мишенью, а другое связывается со второй клеткой, в результате чего стимулируется цитоллиз клетки-мишени. В таких случаях может оказаться желательным минимизировать воздействие на эффекторную часть, которая может каким-либо иным образом активировать другие клетки, негативно влияющие на нужный результат. Сами "плечи" (т.е. связывающий домен) могут быть получены на основе доменов Ig (например, Fab), или они могут происходить от других белков, как в случае гибридного белка, что будет более подробно описано ниже.

Связывающая молекула может содержать более одной полипептидной цепи, соединенные друг с другом, например, ковалентно или посредством какой-нибудь другой связи (например, посредством гидрофобного взаимодействия, ионного взаимодействия, либо они могут быть соединены друг с другом сульфидными мостиками). Так, например, эта молекула может содержать легкую цепь в комбинации с тяжелой цепью, содержащей эффекторный домен. Для этого может быть использована любая соответствующая легкая цепь, например, наиболее широко используемой легкой цепью аллотипа каппа является Km(3) в основной популяции. Поэтому может оказаться желательным использовать эту обычно используемую легкую цепь аллотипа

каппа, поскольку относительно небольшое число членов данной популяции будет воспринимать ее как чужеродную.

Обычно, мишенью является антиген, присутствующий на клетке, либо рецептор с растворимым лигандом, за связывание с которым конкурирует данное антитело.

Она может быть выбрана в качестве терапевтической мишени, а поэтому было бы желательным, чтобы эта мишень связывалась с молекулой, имеющей вышеописанные свойства, например, для конкуренции с нежелательными антителами или для их вытеснения. Альтернативно, может оказаться желательным, чтобы эта молекула *per se* связывалась с молекулой-мишенью, не вызывая при этом клеточно-опосредованной деструкции; воспалительной реакции, стимулированной антителом; или лизиса клеток комплемента. Аналогично, эффекторный домен может участвовать, главным образом, в опосредовании транспорта и/или в увеличении периода полужизни в сыворотке, - и в таких случаях связывающий домен и молекула-мишень могут представлять собой одну систему, которая, исходя из этих признаков, должна иметь определенные преимущества.

Выбор целей применения, где связывающие молекулы настоящего изобретения могут быть использованы в качестве терапевтических антител, имеющих инертные (в некоторых отношениях) Fc-области, осуществляют в соответствии со следующими критериями:

1) Конкурирование с материнскими аллоантителами IgG за связывание с антигенной детерминантой на клетках крови плода/новорожденного.

Аутоиммунные расстройства фетальных клеток крови имеют общий патогенез. В данном случае происходит синтез аллоантител IgG у матери в ответ на унаследованный по отцовской линии антиген, присутствующий на эритроцитах, гранулоцитах или тромбоцитах плода. Затем происходит транспорт аллоантител через плаценту. У плода или новорожденного происходит деструкция сенсibilизированных антителом фетальных клеток крови, что может приводить к клинически значимому снижению уровней соответствующих клеток в кровотоке. Терапевтические антитела против соответствующего эпитопа, но имеющие Fc-область, которая не стимулирует деструкцию, могут конкурировать с материнским антителом за связывание с фетальными клетками, ингибируя, тем самым, их деструкцию.

Антитела против аллоантигенов эритроцитов приводят к гемолитической болезни плода и новорожденного

Аллоантигенами эритроцитов, имеющими важное значение, являются системы группы крови по резус-фактору и группы крови Келл. Случаи заболеваемости гемолитической болезнью, обусловленной антигеном RhD, резко сократилось после предпринятых мер по постнатальной профилактике, но они все еще имеют место вследствие материнской сенсibilизации во время первой беременности. Гемолитическую болезнь могут также вызывать и другие резус-антигены (C, c, E, e), поскольку они могут продуцировать антитела против антигена Келл (Kl), которые, помимо этого, также способствуют снижению уровня эритропоэза в костном мозге плода.

Современная терапия, проводимая по отношению к плоду с

тяжелыми поражениями, предусматривает регулярное внутриутробное переливание негативной по антигену эритроцитарной массы. Было показано, что введение неспецифического иммуноглобулина не давало эффекта при этом состоянии. Анемия и гипербилирубинемия у новорожденных может потребовать обменной трансфузии и/или фототерапии.

Эксперименты с использованием инертных Fc-конструкций с RhD-специфичностью (обозначенных Fog-1) продемонстрировали их неспособность стимулировать эффекторные механизмы (активацию моноцитов, обнаруживаемую посредством хемилюминесценции и ADCC), и, что самое главное, было также показано, что ингибирование хемилюминесценции и ADCC стимулируется человеческой сывороткой, содержащей поликлональные антитела против D. Ранее было показано, что ADCC и хемилюминесценция позволяют прогнозировать деструкцию эритроцитов *in vivo*. В опубликованной ранее работе была также продемонстрирована способность Fog-1 конкурировать с большинством сывороточных антител против D для эпитопов на белке RhD.

Антитела против аллоантигенов тромбоцитов приводят к аллоиммунной тромбоцитопении плода и новорожденных

Большинство релевантных антигенов представляет собой антиген тромбоцитов человека (HPA)-1a. Присутствие антител против HPA-1a приводит к осложнению беременности в 1 случае из 350 нормальных беременностей и к тяжелой тромбоцитопении плода в 1 случае из 1200. В наиболее тяжелых случаях это приводит к внутричерепной геморрагии или к гибели плода. Современными методами терапии являются еженедельные трансфузии HPA-1a-

негативных тромбоцитов (которые могут приводить к гибели плода с вероятностью 0,5% на процедуру), и, при этом, матери вводится внутривенно высокая доза иммуноглобулина, что в итоге может приводить к различным и непредсказуемым эффектам. HPA-1a определяется одним эпитопом на гликопротеине IIIa (GPIIIa) тромбоцитов; и одноцепочечный Fv, распознающий этот эпитоп, доступен в Кембриджском университете на отделении Медицинской трансфузии (Griffin HM, Ouwehand WH. A human monoclonal antibody specific for the Leucine-33 (PA^{A1}, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. Blood 1995; 86: 4430-4436). Было показано, что связывание антитела, полученного на основе этой конструкции, с тромбоцитами человека ингибируется человеческой антисывороткой против HPA-1a. Это ингибирование более всего присуще сыворотке с наиболее высоким титром специфических антител, с которыми ассоциируется наиболее тяжелое заболевание. Это свидетельствует о том, что рекомбинантное антитело и сывороточные антитела связываются с одним и тем же эпитопом на тромбоцитах.

В вышеуказанных применениях и в применениях, описанных ниже, помимо конкурентного связывания, терапевтические антитела настоящего изобретения могут также стимулировать преимущественное ингибирующее действие посредством FcγRIIb.

2) Конкурирование с аутоантителом за связывание с эпитопом на аутоантигене

Опосредованная аутоантителом деструкция клеток крови

Гемолитическая анемия, вызываемая аутоантителами IgG

теплового типа, и тромбоцитопения, вызываемая аутоантителами, имеют одинаковый механизм деструкции клеток крови. В обоих случаях аутоантитела направлены на выбранный набор аутоантигенов (Rh и K на эритроцитах, и GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V на тромбоцитах). Связывание аутоантитела укорачивает продолжительность жизни клеток крови, что приводит к анемии или тромбоцитопении, соответственно. Весьма возможно, что аутоантитела против эритроцитов и тромбоцитов направлены на ограниченное число В-клеточных эпитопов на их соответствующих аутоантигенах. Антитела с рекомбинантным вариабельным доменом против этих эпитопов могут быть продуцированы методом фагового отображения гена V. Терапевтические антитела к соответствующим эпитопам, имеющие инертную Fc-область, могут конкурировать с аутоантителами клеток крови пациента за связывание с аутоантигеном, что приводит к ингибированию деструкции клеток крови.

Синдром Гудпасчера (заболевание, вызываемое антителами против гломерулярной базальной мембраны [ГБМ])

Это заболевание является, в основном, причиной быстро прогрессирующего гломерулонефрита, приводящего к легочному кровотечению и к последней стадии почечной недостаточности через несколько недель или месяцев после начала заболевания. Стандартная терапия основана на диализе в сочетании с интенсивной заменой плазмы и иммуносупрессивной терапией, которая сама по себе может осложняться возможным внесением опасных для жизни условно-патогенных грибковых и вирусных инфекций. Существует множество данных, свидетельствующих о

том, что это заболевание опосредуется аутоантителами, и этот аутоантиген локализован на коллагене типа IV, главном компоненте ГБМ. Было показано, что аутоантитела при заболевании ГБМ связываются с неколлагенным (NC1) доменом $\alpha 3(\text{IV})$ -цепи. Был клонирован и секвенирован ген, кодирующий эту последовательность (COL4A3). Авторами была высказана гипотеза, что негативное действие аутоантител против ГБМ может быть нейтрализовано моноклональной молекулой-конкурентом IgG, которая направлена на иммунодоминантный эпитоп на $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ и имеет, благодаря конструированию, биологически неактивный Fc-домен. Можно получить рекомбинантное химерное антитело IgG, которое связывается с иммунодоминантным эпитопом $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, но в котором отсутствуют классические эффекторные функции. Можно достичь этой цели, поскольку были сконструированы и охарактеризованы гены, кодирующие переменные домены мышиного антитела против $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Pusey C.D. et al., Lab. Invest. 1987, 56; 23-31 & Ross C.N. et al., Lab. Invest. 1996, 74; 1051-1059).

И в этом случае, помимо конкурентного связывающего действия, терапевтические антитела настоящего изобретения могут также стимулировать преимущественное ингибирующее действие посредством Fc γ RIIb.

3) Аллергия и астма

Аллергии и астма возникают вследствие несоответствующего иммунного ответа на наиболее распространенные антигены окружающей среды, такие как белки пыльцы растений, клещей домашней пыли и многие другие широко распространенные

источники антигенов, например, белок Der P1 клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*. У пораженных индивидуумов продуцируются высокие уровни иммуноглобулинов, особенно, класса IgE. Эти антитела IgE способны связываться с высокоаффинным рецептором Fc-эпсилон RI на тучных клетках и на эозинофилах. Перекрестное связывание рецептора, связанного с IgE посредством аллергена, приводит к активации клеток и дегрануляции. Благодаря этому высвобождается ряд медиаторов воспаления, которые могут вызывать тяжелые симптомы или даже приводить к смертельному исходу в результате анафилактической реакции. Могут быть рассмотрены два механизма действия блокирующего антитела. Согласно первому механизму, антитело IgG с инертной Fc-областью может конкурировать за связывание аллергена с IgE. Это должно предотвращать перекрестное связывание IgE, и следовательно, предупреждать активацию клеток. При этом механизме антитело IgG с инертным Fc должно прямо конкурировать за связывание аллергена с IgE.

Второй важный механизм заключается в роли, которую играет негативная передача сигнала посредством рецептора FcγRIIb. Было показано, что перекрестное связывание Fc-гамма RIIb и Fc-эпсилон RI приводит к ингибированию сигналов активации, обычно наблюдаемых в том случае, когда перекрестно-связанными являются лишь рецепторы Fc-эпсилон RI. Таким образом, введение антитела IgG с Fc-связывающей способностью для Fc-гамма RIIb и с антигенной специфичностью для аллергена может приводить к ингибированию активации IgE-сенситизированных тучных клеток и эозинофилов. Для этого антитело IgG должно

также опосредовать его сильное негативное воздействие в том случае, когда оно связано с аллергеном посредством другого сайта, не являющегося сайтом для IgE, так, чтобы они оба могли одновременно связываться с аллергеном.

4) Воспалительные расстройства, например, болезнь Крона

Имеется ряд расстройств иммунной системы, которые, очевидно, вызывают патологию, являющуюся результатом хронического состояния активации иммунных клеток (лейкоцитов), включая Т-лимфоциты, нейтрофиллы и клетки-киллеры. Эта хроническая активация обычно наблюдается как воспалительное состояние с продолжительной миграцией активированных клеток в пораженные ткани. Для миграции в эти ткани, эти клетки должны получать и реагировать на медиаторы воспаления, а затем осуществлять регуляцию адгезивных молекул так, чтобы они могли сначала прикрепляться к клеткам, выстилающим стенки кровеносных сосудов, а затем мигрировать между клетками стенок сосудов и в ткани. Этот цикл воспалительного процесса может быть прекращен путем блокирования либо адгезивных молекул на поверхности лейкоцитов, либо соответствующих лигандов на активированных эпителиальных клетках, выстилающих стенки сосудов. Таким активационным антигеном является VAP-1, и антитело с инертной Fc-областью, которое связываясь с этой молекулой, должно предотвращать прилипание лейкоцитов и миграцию в очаги воспаления, и, тем самым, прекращать цикл хронической активации.

5) Ингибирование взаимодействия "лиганд/рецептор"

Серповидно-клеточная анемия

Гомозиготность по варианту человеческого гемоглобина, характеризующаяся заменой глутаминовой кислоты (HbSS) на валин, приводит к хроническому гемолизу и тенденции молекулы образовывать тактоид в дезоксигенированном состоянии. Это приводит к тому, что эритроциты в капиллярном кровообращении приобретают серповидную форму, вызывая серповидные "кризы" в локальных участках. Эти кризы могут быть тромботическими (в кости, легких, головном мозге или брюшине), апластическими, гемолитическими или ассоциированными с массивной секвестрацией эритроцитов в селезенке и печени. Предполагается, что во время этих кризов, эритроциты прилипают к эндотелиальным клеткам. Этот процесс адгезии основан на взаимодействии нескольких рецепторов с их соответствующими лигандами. Два доминирующих пути адгезии представляют собой взаимодействие между лютераном и ламинином, и между тромбоспондином и еще не определенным мембранным липидом эритроцитов. В экспериментах на животных авторами было получено подтверждение того факта, что рекомбинантные антитела с человеческим переменным доменом, направленные против тромбоспондина, способствуют снижению уровня адгезии серповидных эритроцитов к эндотелиальным клеткам. Авторами было высказано предположение, что аналогичные рекомбинантные антитела с переменным доменом, направленные против ламинин-связывающего домена лютерана (мембранный проксимальный домен), который блокирует взаимодействие с ламинином, могут быть получены методом фагового отображения гена V. Для продуцирования терапевтических антител, способных препятствовать адгезии серповидных эритроцитов к

эндотелиальным клеткам, не вызывая, при этом, деструкции эритроцитов, эти фрагменты антитела с переменным доменом могут быть снабжены инертными Fc-доменами.

Опосредованное антителом блокирование коллагеновых рецепторов тромбоцитов

Авторами было получено явное свидетельство того, что для активации субэндотелиальных коллагенов, то есть, события, инициирующего тромбоз, решающую роль играют два рецептора: интегрин $\alpha_2\beta_1$ (гликопротеин тромбоцитов Ia/IIa), который, по своей функции, рассматривается как адгезивный, и не-интегриновый гликопротеин VI (GpVI), играющий главную роль в активации с последующей секрецией и агрегацией. Методом фагового отображения генов V могут быть получены рекомбинантные антитела человека, распознающие различные домены в каждом рецепторе, и эти антитела могут быть использованы для продуцирования ведущих антител с инертным Fc-доменом для антитромботической терапии на основе коллагена. Эти антитела могут быть использованы для лечения коронарного тромбоза, рестеноза после ангиопластики и тромботических осложнений, ассоциированных с обходным сосудистым шунтированием.

6) Моноклональные антитела иногда используются для блокирования клеточных функций, например, ОКТ3 используется для иммуносупрессии Т-клеток путем блокирования Т-клеточных рецепторов, а CD18-антитела используются для предупреждения межклеточной адгезии посредством интегриновых молекул. Однако, связывание Fc с Fc-рецепторами может стимулировать серьезные

побочные эффекты в результате стимуляции высвобождения цитокинов и воспаления.

7) Fc-области антител иногда присоединяют к другим рекомбинантным белкам с получением гибридных молекул с пролонгированным периодом биологической полужизни. Так, например, TNF-рецептор был присоединен к Fc-области человеческого IgG4 с образованием молекулы, которая ингибирует действие растворимого TNF, а антитело CTLA4 было получено в виде гибридного белка с Fc-областью IgG и использовано для блокирования передачи сигнала посредством молекулы корецептора B7 (лиганда для CTLA4) на клеточных поверхностях. Однако, и в этом случае, высвобождение цитокина, стимулируемое посредством Fc-области гибридного белка, является нежелательным.

V-домены или другие связывающие области, соответствующие типам применения, конкретно обсуждавшимся выше, хорошо известны специалистам. Так, например, CD3-связывающий домен (например, YTH12.5) описан Routledge et al., (1991) Eur. J. Immunol. 21, 2717-2725 & Bolt et al., (1993) Eur. J. Immunol. 23, 403-411. CD52-связывающий домен (например, CAMPATH-1) описан Reichmann et al., (1988) Nature 332, 323-327. VAP-1-связывающий домен описан Salmi et al., (1993) J. Exp. Med. 178:2250-60 & Smith et al. (1998) J. Exp. Med. 188:17-27. Домен Der p I (например, 2C7) описан McElveen et al., (1998) Clin. Exp. Allergy 28, 1427-1434.

Таким образом, связывающая молекула, которая не связывается с Fc-рецепторами и стимулирует цитолиз, и которая не активирует комплемент, но связывается с молекулой-мишенью,

может быть использована во всех вышеуказанных примерах для минимизации каких-либо побочных эффектов. В частности, такое "блокирующее" антитело может быть введено в вышеуказанных случаях 1-5 и может предотвращать нежелательную деструкцию, вызываемую природными антителами. Такими же самыми Fc-областями блокирующего типа должны быть Fc-области, выбираемые для использования в рекомбинантных антителах, таких как антитела CD3 или CD18, в вышеуказанном случае 6, или выбираемые в качестве Fc-областей для гибридных белков в вышеуказанном случае 7.

Связывающий и эффекторный домены могут быть объединены подходящим методом. Так, например, эти домены могут быть ковалентно связаны посредством боковых цепей. Альтернативно, для перекрестного сшивания доменов антитела были использованы сульфгидрильные группы, образованные химическим восстановлением цистеиновых остатков (Rhind, S.K (1990) EP 0385601 Cross-linked antibodies and processes for their preparation). И наконец, для осуществления перекрестного сшивания была использована химическая модификация углеводных групп в целях генерирования реакционноспособных групп. Такими методами являются стандартные методы, известные специалистам. Они могут быть, в основном, использованы в тех вариантах осуществления изобретения, где связывающий полипептид содержит небелковые части или группы.

В основном, для экспрессии связывающей молекулы в виде гибридного белка, более подходящим может быть использование рекомбинантной техники. Методы и материалы, предусматривающие

использование этой техники, составляют другие аспекты настоящего изобретения, описанные ниже.

Нуклеиновые кислоты

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей связывающую молекулу, описанную выше.

Нуклеиновыми кислотами настоящего изобретения могут быть кДНК, РНК, геномная ДНК (включая интроны) и модифицированные нуклеиновые кислоты или аналоги нуклеиновых кислот (например, нуклеиновая кислота, связанная с пептидом). При определении ДНК-последовательности, например, со ссылкой на рисунок, то, если это не оговорено особо, этот термин включает РНК-эквивалент, при этом там, где это необходимо, Т заменяется на U.

Нуклеиновокислотные молекулы настоящего изобретения могут быть выделены и/или очищены из их природных источников, в основном, в чистой или гомогенной форме, либо в форме, не содержащей, или не содержащей в основном, других нуклеиновых кислот, происходящих от этого вида. Используемый здесь термин "выделенный" охватывает все указанные возможные случаи.

Нуклеиновокислотные молекулы могут быть целиком или частично синтетическими. В частности, они могут быть рекомбинантными в том смысле, что они содержат нуклеиновокислотные последовательности, которые вместе не встречаются в природе (не являются смежными друг с другом), и которые были лигированы или соединены искусственно каким-либо другим способом. Альтернативно, они могут быть синтезированы

прямым методом, например, с использованием автоматического синтезатора.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к нуклеиновой конструкции, например, к реплицируемому вектору, содержащему нуклеиновокислотную последовательность.

Вектор, включающий нуклеиновую кислоту настоящего изобретения, необязательно должен содержать промотор или другую регуляторную последовательность, а особенно, если этот вектор используется для введения нуклеиновой кислоты в клетку для ее рекомбинации в геном.

Предпочтительно, чтобы эта нуклеиновая кислота в векторе находилась под контролем соответствующего промотора или других регуляторных элементов или была правильно соединена с ними для транскрипции в клетке-хозяине, такой как микробная клетка (например, бактериальная, дрожжевая, гифомицетная клетка) или эукариотическая клетка (например, клетка насекомого, растения, млекопитающего).

Этот вектор, в частности, может содержать ген (например, *gpt*), позволяющий проводить отбор в хозяине или в клетке-хозяине, и один или несколько энхансеров, подходящих для данного хозяина.

Этот вектор может быть бифункциональным экспрессирующим вектором, который функционирует во многих хозяевах. В случае геномной ДНК, она может содержать свой собственный промотор или другие регуляторные элементы, а в случае кДНК, она может находиться под контролем соответствующего промотора или других регуляторных элементов для экспрессии в клетке-хозяине.

Термин "промотор" означает последовательность нуклеотидов, с которой может инициироваться транскрипция ДНК, правильно присоединенная к этому промотору и расположенная ниже (то есть, в направлении к 3'-концу смысловой цепи двухцепочечной ДНК). Этот промотор может быть, но необязательно, индуцибельным промотором.

Термин "правильно присоединенный" означает соединенный в виде части той же самой нуклеиновокислотной молекулы, локализованной и ориентированной таким образом, чтобы с этого промотора могла инициироваться транскрипция. "ДНК, правильно присоединенная к промотору", означает, что "инициация ее транскрипции регулируется" этим промотором.

Таким образом, в этом аспекте своего осуществления, настоящее изобретение относится к генной конструкции, а предпочтительно, к реплицируемому вектору, содержащему промотор, правильно присоединенный к нуклеотидной последовательности настоящего изобретения.

Вообще говоря, каждый специалист может сконструировать векторы и составить протоколы для экспрессии рекомбинантного гена. Могут быть выбраны или сконструированы подходящие векторы, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, терминаторные фрагменты, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности, если это необходимо. Более подробно см., например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory

Press.

Многие известные методы и протоколы, используемые для манипуляции с нуклеиновыми кислотами, например, при получении нуклеиновокислотных конструкций, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов, и анализы белков подробно описаны в *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992. Описания Sambrook et al. и Ausubel et al. вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Клетки-хозяева и методы

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансформированным с помощью экспрессирующих векторов, определенных выше. Настоящее изобретение также относится к клеточным культурам (предпочтительно, клеток грызунов) и к продуктам клеточных культур, содержащих связывающие молекулы.

Настоящее изобретение также относится к способам получения связывающих молекул настоящего изобретения, предусматривающим:

(i) объединение нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающий домен, с нуклеиновой кислотой, кодирующей эффекторный домен, с образованием нуклеиновокислотной конструкции;

(ii) стимулирование или обеспечение экспрессии этой конструкции в подходящей клетке-хозяине.

Объединение нуклеиновых кислот с получением конструкции может быть осуществлено любым подходящим методом, известным специалистам, например, путем лигирования фрагментов

(например, рестрикционных фрагментов) или путем использования различных матриц в одной или нескольких стадиях амплификации, например, с использованием ПЦР.

Методы продуцирования антител (а следовательно и связывающих доменов) предусматривают иммунизацию млекопитающего (например, человека, мыши, крысы, кролика, лошади, козы, овцы, верблюда или обезьяны) соответствующим целевым белком или его фрагментом. Антитела могут быть получены от иммунизированных животных любым из методов, известных специалистам, и они могут быть скринированы, предпочтительно, путем связывания антитела с нужным антигеном.

Так, например, могут быть использованы методы вестерн-блоттинга или иммунопреципитации (Armitage et al., 1992, Nature 357:80-82).

Клонирование и экспрессия химерных антител описана в EP-A-0120694 и в EP-A-0125023.

В соответствии с описанием настоящего изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая эффекторный домен, может быть получена посредством сайт-направленного мутагенеза, например, способами, описанными в настоящей заявке или в опубликованных работах (см., например, WO92/16562 или WO95/05468, обе Lynxvale Ltd.).

Другие аспекты

Настоящее изобретение также относится к использованию связывающих молекул настоящего изобретения для предупреждения, ингибирования или предотвращения каким-либо другим способом связывания второй связывающей молекулы с молекулой-мишенью.

Это использование может предусматривать конкурирование с антителом или его вытеснение из терапевтически релевантного антигена-мишени или клетки-мишени.

Настоящее изобретение также относится к реагенту, который включает вышеописанную связывающую молекулу, независимо от того, продуцирована ли эта молекула рекомбинантным способом или каким-либо другим способом.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическому препарату, содержащему вышеописанную связывающую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, предусматривающему введение указанному пациенту вышеуказанного фармацевтического препарата, или его введение в образец (например, в пробу крови), взятый у этого пациента, а затем снова возвращенный этому пациенту. Этот способ, в частности, пригоден для лечения следующих заболеваний: реакция "трансплантат против хозяина", реакция "хозяин против трансплантата", реакция отторжения трансплантированного органа, реакция отторжения трансплантированного костного мозга, аутоиммунные болезни, аллоиммунные болезни; аллергия; хронические или острые воспалительные заболевания.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, предусматривающему стимуляцию или обеспечение экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающую молекулу, описанную выше, благодаря чему эта связывающая молекула оказывает свое действие на пациента *in vivo*. Экспрессия, обычно, происходит в организме пациента или, в

некоторых отдельных случаях, когда данным пациентом является еще не родившийся ребенок, в организме его матери.

Настоящее изобретение также относится к использованию связывающей молекулы, описанной выше, при изготовлении фармацевтического препарата для модификации иммунного ответа, а в частности, фармацевтического препарата для лечения заболеваний, описанных выше.

Для более ясного понимания настоящего изобретения ниже приводятся примеры с более подробным описанием вариантов его осуществления, которые носят лишь иллюстративный характер и не должны рассматриваться как ограничение изобретения. Исходя из этих примеров, каждый специалист может использовать и другие варианты осуществления изобретения, не выходящие за рамки объема изобретения.

Чертежи

Фиг. 1

Образование эритроцитами, сенсibilизированными антителами против Fog-1, розеток с FcγRI-несущими клетками. Эритроциты R₂R₂ сенсibilизировали антителами Fog-1 при определенном интервале концентраций антител, инкубированных с клетками B2KA, культивированными в 96-луночной планшете, и определяли процент клеток B2KA, агрегированных с розетками эритроцитов. Столбцы ошибок указывают на величины стандартного отклонения в лунках в тройных дубликатах. Для мутантов Fog-1 G1Δb, G1Δc, G1Δab, G1Δac, G2Δa, G4Δb и G4Δc, как и для G2 (показано) не наблюдалось образование розеток между клетками B2KA и эритроцитами при любых сенсibilизирующих концентрациях.

Фиг. 2

Флуоресцентное окрашивание FcγRI-несущих клеток. Клеточные линии FcγRI-трансфектанта, В2КА (а и b) и 3Т3+FcγRI+γ-цепь (с и d) последовательно инкубировали с серией антител САМРАТН-1 (а и с) или Fog-1 (b и d), с биотинилированными антителами против κ-цепи антитела человека, и с комплексом экстравидин-ФИТЦ (ExtrAvidin-ФИТЦ). Интенсивности флуоресценции определяли для 10000 событий и строили график зависимости для среднегеометрического числа каналов флуоресценции.

Фиг. 3

Графическое представление флуоресцентно окрашенных FcγRI-несущих клеток в виде гистограммы. Клетки В2КА окрашивали как показано на Фиг. 2, с использованием 100 мкг/мл антител серии САМРАТН-1. Эта гистограмма показывает, что число клеток, уменьшающихся в каждом канале флуоресценции, совпадает для репрезентативных антител.

Фиг. 4

Хемилюминесцентный (ХЛ) ответ моноцитов человека на эритроциты, сенсibilизированные серией антител Fog-1. Эритроциты R₁R₁ сенсibilизировали антителами при ряде концентраций. Число связанных молекул антитела на клетку и ХЛ-ответ моноцитов на эритроциты были определены для каждого образца, описанного выше.

Фиг. 5

Ингибирование хемилюминесценции (ХЛ), вызванной антителом Fog-1 G1, другими антителами Fog-1. Эритроциты

сенсibilизировали 2 мкг/мл Fog-1 G1 и различными концентрациями указанных антител Fog-1. На фиг. 4 эти антитела (Ab) дают низкий уровень ХЛ-ответа. Был измерен ХЛ-ответ моноцитов. Этот ответ, вызванный 2 мкг/мл лишь одного G1, принимали за 100%.

Фиг. 6.

Ингибирование ХЛ-реакции Fog-1 G2Δa в ответ на клиническую сыворотку. Эритроциты сенсibilизировали постоянным количеством Fog-1 G1 (20 мкг/мл) или клинически релевантной сывороткой и различными количествами Fog-1 G2Δa. 100%-ный ответ достигался с использованием стандартного количества BRAD 5. В отсутствии Fog-1 G2Δa % ответов составляли: G1 - 150%; сыворотка А - 142%, сыворотка В - 265%, сыворотка С - 200%, сыворотка D - 163 %, сыворотка Е - 94%, анти-С+D антисыворотка - 259 % и анти-К антисыворотка - 119%.

Фиг. 7.

Комплемент-зависимый лизис, опосредуемый серией антител CAMPATH-1. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека метили ⁵¹Cr и инкубировали с антителами в присутствии сыворотки как источника комплемента. Строили график % специфического высвобождения Cr как показателя происходящего лизиса.

Фиг. 8

Ингибирование антителом CAMPATH-1 G2Δa комплемент-зависимого лизиса, опосредованного антителом CAMPATH-1 G1. Комплемент-зависимый лизис осуществляли как показано на фиг.7, за исключением того, что образцы содержали постоянное

количество (конечная концентрация 6,25 мкг/мл) CAMPATH-1 G1 и возрастающее количество CAMPATH-1 G2Δa.

Фиг. 9

Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), опосредованная серией антител CAMPATH-1. МКПК человека метили ^{51}Cr и инкубировали с антителом. После промывки эти клетки инкубировали с МКПК, действующими как эффекторные клетки и добавленными в отношении эффектор:мишень=20:1. Строили график для % специфического высвобождения Cr как показателя происходящего лизиса.

Фиг. 10a

ADCC RhD⁺-эритроцитов, опосредованная серией антител Fog-1.

Фиг. 10b

ADCC RhD⁺-эритроцитов, опосредованная серией антител Fog-1.

Фиг. 11a

Ингибирование *антителами Fog-1 ADCC RhD⁺-эритроцитов, опосредованной антителом Fog-1 G1 при концентрации 2 нг/мл.

Фиг. 11b

Ингибирование антителами Fog-1 ADCC RhD⁺-эритроцитов антителами Fog-1, опосредованной антителом Fog-1 G1. Эритроциты сенсibilizировали в смеси антител, состоящей из постоянного количества Fog-1 G1 (2 нг/мл) и различных концентраций антител-ингибиторов.

Фиг. 12

Ингибирование антителами Fog-1 ADCC RhD⁺-эритроцитов,

опосредованной поликлональным антителом против RhD при концентрации 3 нг/мг.

Фиг. 13а

Флуоресцентное окрашивание FcγRIIa 131H/H-несущих клеток. Клетки линии трансфектантов 3T6+FcγRIIa 131H/H инкубировали с антителами Fog-1, образующими комплекс с козьим F(ab')₂ против каппа-цепи человека, а затем с ФИТЦ-конъюгированными ослиными антителами против козьих IgG. Интенсивности флуоресценции измеряли для 10000 событий и строили график для среднегеометрического числа канала флуоресценции.

Фиг. 13b

Флуоресцентное окрашивание FcγRIIa 131R/R-несущих клеток. Клетки линии трансфектантов 3T6+FcγRIIa 131R/R инкубировали с антителами Fog-1, образующими комплекс с ФИТЦ-конъюгированным козьим F(ab')₂ против каппа-цепи человека. Интенсивности флуоресценции измеряли для 10000 событий и строили график для среднегеометрического числа канала флуоресценции.

Фиг. 14а

Флуоресцентное окрашивание FcγRIIb1*-несущих клеток. Эксперимент осуществляли как описано для фиг. 13b, с использованием линии трансфектантов 3T6+FcγRIIb1* и комплексобразующих антител Fog-1 с использованием смеси ФИТЦ-конъюгированных и немеченых козьих F(ab')₂ против каппа-цепи человека.

Фиг. 14b

Флуоресцентное окрашивание FcγRIIb NA1-несущих клеток.

Эксперимент осуществляли как описано для фиг. 13, с использованием линии трансфектантов CHO+FcyRIIb NA1.

Фиг. 14с

Флуоресцентное окрашивание FcyRIIb NA2-несущих клеток. Эксперимент осуществляли как описано для фиг. 13, с использованием линии трансфектантов CHO+FcyRIIb NA2.

Фиг. 15

На этом чертеже представлена Таблица 1, в которой сравниваются мутации, внесенные в последовательности дикого типа G1, G2 и G4.

Фиг. 16

На этом чертеже представлена Таблица 2, в которой приводятся систематизированные данные активностей антител.

Фиг. 17

На этом чертеже представлены последовательности некоторых модифицированных последовательностей и последовательностей дикого типа C_H2, включая последовательности, обозначенные G1Δab, G2Δa, G1Δac.

Примеры

Основные материалы и методы

Конструирование экспрессирующих векторов

В качестве исходного материала для константной области IgG1 использовали ген константной области человеческого IgG1 аллотипа G1m(1,17) в векторе версии M13tg131, который содержит модифицированный полилинкер (Clark M.R.: WO 92/16562). Таким образом, 2,3 т.п.о.-вставка IgG1 имеет BamHI-сайт у 5'-конца, и содержит HindIII-сайт, смежный с BamHI-сайтом. У 3'-конца,

ниже от сигнала полиаденилирования, присутствуют следующие сайты в направлении 5' → 3': *SphI*, *NotI*, *BglII*, *BamHI*. Ген константной области человеческого IgG2 был получен в виде *HindIII*-*SphI*-фрагмента в M13tg131, а *HindIII*-сайт был разрушен путем рестрикции ферментом *HindIII* с застраиванием выступающих концов и их лигированием. *SalI*-*SphI*-фрагмент этого вектора клонировали для замены эквивалентного фрагмента в векторе IgG1, описанном выше. Ген константной области человеческого IgG4 был получен в виде *HindIII*-*SmaI*-фрагмента в M13tg131, а *HindIII*-сайт был разрушен. *SmaI*-сайт находится между 3'-концом экзона CH3 и сайтом полиаденилирования, и таким образом, этот сайт полиаденилирования был сохранен путем добавления *SmaI*-фрагмента из вектора IgG1, который содержит ДНК, локализованную между эквивалентным *SmaI*-сайтом в гене IgG и *SmaI*-сайтом, расположенным ниже от этого гена в полилинкере.

Первая процедура заключалась во введении рестрикционного *XbaI*-сайта между экзонами CH1 и шарнирной области, *XhoI*-сайта между экзонами шарнирной области и CH2, и *KpnI*-сайта между экзонами CH2 и CH3 для облегчения замены мутантных последовательностей экзонов. Эта процедура аналогична манипуляции с генами IgG1 и IgG4, проводимой ранее (Greenwood, J., Clark, M. & Waldmann, H. (1993) Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. Eur. J. Immunol. 23, 1098-1104).

Для получения матричных ДНК *E.coli* RZ1032 инфицировали M13, описанным выше, и получали одноцепочечную ДНК (оцДНК). Этот штамм представляет собой *dut⁻ung⁻* такой, что

продуцированная оцДНК должна содержать некоторое число уридина вместо тимидина.

Для введения мутаций были использованы следующие олигонуклеотиды:

между экзонами шарнирной области и CH2

MO10 5'GGA TGC AGG CTA CTC GAG GGC ACC TG 3'

между экзонами CH2 и CH3

MO11 5' TGT CCA TGT GGC CCT GGT ACC CCA CGG GT 3'

между экзонами CH1 и шарнирной области

MO12 5' GAG CCT GCT TCC TCT AGA CAC CCT CCC T 3'

Рестрикционные сайты подчеркнуты.

Олигонуклеотиды фосфорилировали в 50 мкл реакционных смесей, содержащих 25 пмоль олигонуклеотида и 5 ед. полинуклеотид-киназы (nbl) T4 в 70 mM Трис-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5 мг/мл BSA, 1 mM АТР. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение одного часа и нагревали при 70°C в течение 5 минут.

Для отжига мутагенных олигонуклеотидов, используемых для матричных ДНК, 500 нг уридин-содержащей ДНК и 1 пмоль каждого фосфорилированного олигонуклеотида инкубировали в 20 мкл 40 mM Трис-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl при 80°C в течение 5 минут и оставляли для медленного охлаждения до 37°C. Объем увеличивали до 30 мкл с использованием того же самого буфера, и добавляли DTT до 7 mM, АТР до 1 mM, и каждый из dATP, dCTP, dGTP и dTTP до 250 мкМ. Затем добавляли 5 ед. ДНК-полимеразы T7 (немодифицированной, United States Biochemical) и 0,5 ед. ДНК-лигазы T4 (Gibco BRL) и реакционную смесь инкубировали при

комнатной температуре в течение 16 часов для синтеза мутантной цепи. ДНК осаждали этанолом, растворяли добавлением 50 мкл 20 mM Трис-НСl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 мг/мл BSA и 1 ед. урацил-ДНК-гликозилазы (New England Biolabs). После инкубирования при 37°C в течение 2 часов добавляли 50 мкл 400 mM NaOH и реакцию смесь оставляли при комнатной температуре на 5 минут для фрагментирования матричной цепи ДНК. ДНК осаждали этанолом, растворяли в H₂O и трансформировали в *E.coli* TG1. Для отбора полученных клонов M13 получали репликативную форму (РФ) ДНК и гидролизировали с обнаружением клонов, которые содержали нужные рестрикционные XbaI-, XhoI- и KpnI-сайты. Подходящие клоны были получены для IgG1- и 4-векторов, но M012, очевидно, не подвергался отжигу в IgG2-векторе, а поэтому мутагенез повторяли для IgG2 без этого олигонуклеотида, поскольку сайт между экзонами CH1 и шарнирной области не нужен для этих экспериментов. Для каждого вектора ДНК-последовательности экзонов были подтверждены путем секвенирования.

Замены в CH2 в положениях аминокислот 327, 330 и 331 (мутация Δa) были введены с использованием следующих олигонуклеотидов:

M022BASC (кодирующая цепь)

5' TCT CCA ACA AAG GCC TCC CGT CCT CCA TCG AGA AAA 3'

M022 (комплементарная цепь):

5' TTT TCT CGA TGG AGG ACG GGA GGC CTT TGT TGG AGA 3'.

Замены в CH2 в положениях аминокислот 233-236 (мутация Δb и Δc) были введены с использованием следующих олиго-

нуклеотидов:

MO7BACK (кодирующая цепь и кодирующая мутацию Δс)

5' TCC TCA GCA CCT CCA GTC GCG GGG GGA CCG TCA GTC 3'

MO21 (комплементарная цепь и кодирующая мутацию Δb):

5' GAC TGA CGG TCC CGC GAC TGG AGG TGC TGA GGA 3'.

Эти мутации были введены с помощью ПЦР посредством перекрывающегося удлинения, которое также требует использования олигонуклеотидов MO11 и MO10BACK

5' CAG GTG CCC TCG AGT AGC CTG CAT CC 3'

Рестрикционный XhoI-сайт подчеркнут.

Для введения мутации Δa в первой серии реакций ПЦР использовали матрицы IgG1 и IgG2, амплифицированные MO22 и MO10BACK, а также MO22BACK и MO11. Для введения мутаций Δb и Δс в первой серии реакций ПЦР использовали матрицы IgG1 и IgG4, амплифицированные MO21 и MO10BACK, а также MO7BACK и MO11. В конечном продукте ДНК, происходящие от цепи, праймированной MO21, должны нести мутацию Δb, а ДНК, происходящие от MO22BACK, должны нести мутацию Δс. Каждая ПЦР-смесь содержала около 30 нг M13tg131+константную область оцДНК, 25 пмоль каждого олигонуклеотида и 1 ед. ДНК-полимеразы Pwo (Boehringer Mannheim) в 50 мкл 10 мМ Трис-HCl, pH 8,85, 25 мМ KCl, 5 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄ и 250 мкМ каждого из dATP, dCTP, dGTP и dTTP. Реакции подвергали 14 циклам: 94°C, 30 сек., 50°C, 30 сек; 72°C, 60 сек, последующие циклы - при 72°C, 5 мин. Полосы, соответствующие продуктам ДНК нужного

размера, вырезали из низкоплавкой агарозы и расплавляли в 100 мкл H_2O . Для введения каждой мутации два первоначальных ПЦР-продукта объединяли вместе с помощью ПЦР путем перекрывающегося удлинения. Приблизительно, 4 мкл всех расплавленных гелевых срезов, так, чтобы при этом первоначальные ПЦР-продукты присутствовали в эквимольных количествах, смешивали с 25 пмоль каждого из MO10BACK и MO11 и с другими компонентами, описанными выше. ПЦР осуществляли за 18 циклов, описанных выше, за исключением того, что температуру при отжиге снижали с 50°C до 48°C. Полученные продукты, содержащие весь экзон CH2, очищали и рестриктировали ферментами XhoI и KpnI. Репликативную форму (РФ) ДНК мутированных векторов M13tg131+константная область, содержащую дополнительные рестрикционные сайты, описанные выше, рестриктировали ферментами XhoI и KpnI для удаления присутствующей области CH2 ДНК и лигировали мутантные области CH2. Образцы ДНК трансформировали в *E.coli* TG1. ДНК соответствующих клонов секвенировали для идентификации правильно мутированных константных областей.

Для получения векторов IgG1 с мутациями Δa и Δb или Δc , ДНК, представляющую собой Δa -мутант, использовали в качестве матрицы для второго цикла ПЦР в целях введения мутаций Δa и Δc , описанных выше.

Каждый из генов IgG1, 2 и 4 дикого типа и гены мутированной константной области вырезали из РФ ДНК в виде BamHI-NotI-фрагмента и клонировали в модифицированный вектор

CAMPATH Hu4VH HuIgG1 pSVgpt (Clark, M.R.: Lynxvale Binding Molecules, см. выше) для замены имеющейся константной области. Полученные векторы обозначали pSVgptCAMPATHHu4VHHuIgG1Δa и т.п. Этот вектор также содержит ген *gpt* для отбора в клетках млекопитающих, энхансер тяжелой цепи мышиного иммуноглобулина и переменную область ДНК CAMPATH-1 Hu4VH, так, что этот вектор несет полный ген тяжелой цепи, который может экспрессироваться в клетках млекопитающих. В экспрессирующем векторе CAMPATH HuVL pSVneo присутствует ген "очеловеченной" легкой цепи CAMPATH-1 (Reichmann, L., Clark, M.R., Waldmann, H. & Winter, G. (1988) Nature 332, 323-327).

ДНК переменной области Fog-1 (Bye, J.M., Carter, C., Cui, Y., Gorick, B.D., Songsivilai, S., Winter, G., Hughes-Jones, N.C. & Marks, J.D. (1992) Germline variable region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rh(D) antibodies. J. Clin. Invest. 90, 2481-2490) были получены в векторе pHEN1. Они были амплифицированы посредством ПЦР с использованием следующих олигонуклеотидов:

FOG1VHBACK 5'-TCC ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTG CAT CTA CAG CAG 3'

FOG1VHFOR 5' GAG GTT GTA AGG ACT CAC CTG AGG AGA CGG TGA CCG T 3'

FOG1VKBACK 5' TCC ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG 3'

FOG1VKFOR 5' GAG GTT GTA AGG ACT CAC GTT TGA TCT CCA GCT TGG T 3'.

5'-часть вставки в векторе M13VHPCR1 (Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T. & Winter, G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833), содержащем промотор и ДНК, кодирующую сигнальный пептид, амплифицировали с использованием универсального обратного праймера M13 и VO3:

5' GGA GTG GAC ACC TGT GGA GA 3'

ДНК, представляющую 3'-конец V_H в M13VNPCR1 и 5'-конец интрона V_H-C_H, получали посредством ПЦР с использованием универсального праймера M13-40 и V04:

5' GTG AGT CCT TAC AAC CTC TC 3'

Эти два сегмента ДНК последовательно присоединяли к обеим V_H- и V_H-амплифицированным ДНК Fog-1 посредством описанной выше ПЦР с перекрывающим удлинением. Рестрикционный BamHI-сайт, являющийся внутренним по отношению к V_H Fog-1, делетировали тем же способом с использованием олигонуклеотидов, которые удаляли сайт распознавания без замены кодируемых аминокислот. Полные ПЦР-продукты клонировали в M13mp19 в виде HindIII-BamHI-фрагментов и подтверждали их ДНК-последовательности.

HindIII-BamHI-фрагмент, содержащий V_H Fog-1, использовали для замены фрагмента, содержащего V_H CAMPATH-1 в векторах pSVgpt, описанных выше, в результате чего получали экспрессирующие векторы, обозначенные pSVgptFoglVNHuIgG2, и т.п. Для векторов IgG1 дополнительный рестрикционный HindIII-сайт у 5'-конца ДНК константной области означает, что простая замена HindIII-BamHI-фрагмента вариабельной области была невозможна. Вместо этого, соответствующие векторы pSVgptCAMPATHNu4VNHuIgG1 были рестриктированы при помощи HindIII. Линкеры, сконструированные для делетирования HindIII-сайта и добавления BamHI-сайта, лигировали по разрезанным концам. Затем ДНК рестриктировали ферментами BamHI и NotI так,

чтобы константные области могли быть выделены и клонированы в pSVgptFoglVNHuIgG2 для замены константной области IgG2.

HindIII-BamHI-фрагмент, содержащий V_κ Fog-1, переносили в вектор pSVhyg-HuCK (Orlandi et al., 1989), который уже содержал энхансер тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина и ген константной области κ-цепи иммуноглобулина человека. Полученный экспрессирующий вектор обозначали pSVhygFoglVKHuCK.

Продуцирование антител

10 мкг каждого экспрессирующего вектора тяжелой цепи и 20 мкг соответствующего экспрессирующего вектора легкой цепи линейаризовали путем рестрикции ферментом PvuI и объединяли в 50 мкл H₂O. Клетки несекретирующей линии крысиной миеломы, YB2/0, культивировали до состояния полуконфлюентности в модифицированной по способу Дульбекко среде Искова (IMDM), содержащей 5% сыворотки плода коровы (FBS). 10⁷ клеток собирали путем центрифугирования, ресуспендировали в 0,5 мл среды и переносили в кювету GenePulser (BioRad). Затем добавляли ДНК и смесь инкубировали на льду в течение 5 минут. На эти клетки подавали один импульс в 960 мкФ/170 В, после чего их снова выдерживали на льду в течение 15 минут, а затем помещали в колбу в 20 мл IMDM + 10% FBS. Эти клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в атмосфере повышенной влажности. Через 24 часа объем удваивали и среду делали селективной путем добавления микофеноловой кислоты до концентрации 0,8 мкг/мл и ксантина до концентрации 250 мкг/мл. Аликвоты клеток распределяли по двум 96-луночным планшетах. Примерно через 18 дней после проведения селекции наблюдалось

появление колоний, и супернатанты анализировали на присутствие IgG с помощью ELISA. Для этого лунки микропланшетов сенсibilизировали козьими Fc-специфическими антителами против человеческих IgG (Sigma), а затем инкубировали с 5-кратным разведением супернатантов. Связанное антитело детектировали путем инкубирования с ПХ-конъюгированными козьими антителами против человеческой к-цепи (Seralab) и проводили анализ с использованием о-фенилендиаминового субстрата. Клетки из лунок, содержащих наибольшее количество антитела, размножали и маточные препараты хранили в замороженном виде.

Клеточную линию, секретирующую наибольшее количество Ab, размножали до 500 мл в IMDM + 2% FBS с получением насыщенного супернатанта для очистки антитела. Этот супернатант осветляли путем центрифугирования и доводили до 0,1М Трис-HCl, pH 8,0. Затем добавляли белок-A-агарозу (Sigma) и смесь перемешивали при 4°C в течение 16 часов. Агарозные сферы собирали в колонку и промывали 0,1М Трис-HCl pH 8,0, а затем 10мМ Трис-HCl pH 8,0. Антитело элюировали 1 мл-аликвотами 0,1 М глицина pH 3,0 в 100 мкл образцы 1М Трис-HCl pH 8,0 и фракции, содержащие значительное количество белка, идентифицировали, исходя из регистрируемых значений A_{280nm} . Эти фракции диализовали против PBS, стерилизовали на фильтре, и снова измеряли A_{280nm} , в результате чего получали концентрацию антитела (концентрация= A_{280nm} x 0,714 мг/мл).

Чистоту и целостность антител подтверждали путем электрофореза в восстанавливающем ПААГ с ДСН с использованием 12,5% акриламида. Эти концентрации тестировали с помощью

ELISA, в котором использовали козы антитела против человеческой к-цепи (Seralab) в качестве захватывающего реагента и биотинилированные козы антитела против человеческой к-цепи (Sigma), а затем комплекс экстравидин-ПХ (ExtrAvidin-HRPO) (Sigma) для детекции. Это означает, что природа тяжелой цепи, по всей вероятности, не влияет на уровень наблюдаемого связывания.

Образование розеток трансфектантов FcγRI

Промытые эритроциты R₂R₂ инкубировали с образцами антитела (Ab) в 100 мл PBS в 96-луночных планшетах при комнатной температуре в течение 1 часа. Эти эритроциты промывали три раза, ресуспендировали в PBS и инкубировали при 37°C в течение 40 минут с трансфектантами, экспрессирующими кДНК FcγRI, B2KA (S.Gorman & G.Hale, не опубликовано), культивированными на 96-луночных планшетах. Супернатант отбрасывали и лунки промывали один раз для удаления избытка эритроцитов. Для каждой лунки оценивали 200 клеток B2KA и отмечали число розеток, образованных эритроцитами. Затем строили график средней величины процента и стандартного отклонения для лунок в тройном дубликate. Альтернативно, сенсibilизированные эритроциты и клетки B2KA смешивали в центрифужных пробирках, осаждали и слегка ресуспендировали, а затем переносили на предметное стекло микроскопа.

Флуоресцентное окрашивание трансфектантов FcγR

Трансфектанты, экспрессирующие кДНК FcγR1, B2KA, и 3T3+FcγRIa+γ-цепь (van Urgt, M.J., Heijnen, I.A.F. M., Capel,

P.J.A., Park, S.Y., Ra, C., Saito, T., Verbeek, J.S. & van de Winkel, J.G.J. (1996), FcR γ -chain is essential for both surface expression and function of human Fc γ RI (CD64) *in vivo*. Blood 87, 3593-3599), были получены в виде моноклеточных суспензий в забуференном фосфатом физиологическом растворе, содержащем 0,1% (масс./об.) NaN₃, 0,1% (масс./об.) BSA (промывочного буфера), с последующей обработкой буфером для диссоциации клеток (Gibco BRL). Клетки осаждали при плотности 10⁵ клеток/лунку в 96-луночных планшетах, ресуспендировали в 100 мкл-разведениях Ab CAMPATH-1 или Fog-1 и инкубировали на льду в течение 30 минут. Клетки три раза промывали 150 мкл/лунку промывочного буфера и аналогичным образом инкубировали с 20 мкг/мл конъюгированного с биотином козьего антитела против каппа-цепи человека (Sigma), а затем с 20 мкг/мл экстравидина-ФИТЦ (Sigma). После последней промывки клетки фиксировали в 100 мкл промывочного буфера, содержащего 1% (об/об) формальдегида. Поверхностную экспрессию Fc γ RI подтверждали путем окрашивания mAb CD64 (Serotec) и ФИТЦ-конъюгированным козьим антителом против мышинных иммуноглобулинов IgG (Sigma). Интенсивность флуоресценции определяли на приборе FACScan (Becton Dickinson).

Для трансфектантов, несущих Fc γ RII, 3T6+Fc γ RIIa 131H/H, 3T6+Fc γ RIIa 131R/R (Warmerdam, P.A.M., van de Winkel, J.G.J., Gosselin, E.J., & Capel, P.J.A. (1990) Molecular basis for a polymorphism of human Fc γ -receptor II (CD32), J. Exp. Med. 172, 19-25; Warmerdam, P.A.M., van de Winkel, J.G.J., Vlug,

A. Westerdaal, N.A.C. & Capel, P.J.A. (1991) A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fcγ receptor II is critical for human IgG2 binding. J. Immunol. 147, 1338-1343) и 3T6 + FcγRIIb1* (Warmerdam, P.A.M., van den Herik-Oudijk, I.E., Parren, P.W.H.I., Westerdaal, N.A.C., van de Winkel, J.G.J. & Capel, P.J.A. (1993) Int. Immunol. 5, 239-247), указанные антитела перед их инкубированием с клетками объединяли в комплексы. Для FcγRIIa 131H/H антитела смешивали с эквимоллярными количествами козьего F(ab')₂ против человеческой каппа-цепи (Seralab) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем комплексы смешивали с этими клетками и проводили анализ, описанный выше, за исключением того, что в качестве детектирующего антитела использовали ФИТЦ-конъюгированные антитела осла против козьих IgG (Serotec). Для FcγRIIa 131R/R эти комплексы получали с использованием эквимоллярных количеств ФИТЦ-конъюгированного козьего F(ab')₂ против человеческой κ-цепи (Seralab), а для FcγRIIb1* эти комплексы получали с использованием эквимоллярных количеств смеси 1:1 ФИТЦ-конъюгированного и немеченого козьего F(ab')₂ против человеческой κ-цепи. Таким образом, для этих рецепторов требуется только одна стадия инкубирования.

Для трансфектантов, несущих FcγRIIb, CHO + FcγRIIb Na1 или NA2 (Bux, J., Kissel, K. Hofmann, C. & Santoso, S. (1999) The use of allele-specific recombinant Fc gamma receptor IIb antigens for the detection of granulocyte antibodies. Blood 93, 357-362), окрашивание осуществляли способом, описанным

выше для клеток 3T6 + FcγRIIa 131H/H.

Сенсибилизация эритроцитов

Эритроциты R₁R₁ группы O промывали в PBS и ресуспендировали в среде RPMI + 10% FBS при конечной концентрации 5% об/об. 10 мкл клеток добавляли к 50 мкл mAb или RPMI/FBS в планшетах с V-образными лунками и инкубировали в течение 60 минут при 37°C. В некоторых экспериментах mAb подвергали серийному разведению в RPMI/FBS для получения IgG, связанного с эритроцитами. В экспериментах по конкурентному связыванию эритроциты сенсибилизировали в смеси из 25 мкл конкурирующих mAb и 25 мкл mAb дикого типа или 25 мкл сыворотки, содержащей аллоантитела. После сенсибилизации клетки 4 раза промывали 200 мкл объемами PBS и ресуспендировали в 50 мкл RPMI/FBS (конечная концентрация = 1% об/об). Во всех экспериментах аликвоту клеток (E-IgG) использовали в хемилюминесцентном (ХЛ) анализе и эту аликвоту анализировали путем проточной цитометрии для определения уровня IgG, связанных с эритроцитами.

Хемилюминесцентный анализ

МКПК выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности из EDTA-антикоагулированной крови, взятой от 6 нормальных доноров. МКПК 4 раза промывали PBS, содержащим 1% BSA, не содержащего глобулина, а затем ресуспендировали при 2×10^6 /мл в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), содержащем 25% RPMI и 2,5% FBS. Аликвоты (100 мкл) распределяли по 96-луночным плоскодонным белым непрозрачным планшетах и инкубировали в течение 2 часов при 37°C в

увлажненной атмосфере воздуха с 5% CO₂. Затем планшеты помещали в люминометр (Anthos Lucy 1, Labtec International, Uckfield, UK) и в каждую лунку добавляли 100 мкл HBSS, содержащего 4 x 10⁻⁴ М люминола (Sigma) и 20 мкл E-IgG. После этого проводили мониторинг ХЛ-ответа при 37°C в течение 60 минут.

Определение IgG, связанного с эритроцитами

25 мкл-аликвоты E-IgG переносили в планшет с V-образными лунками, промывали один раз PBS, центрифугировали с получением остатка, который ресуспендировали в 50 мкл ФИТЦ-конъюгированного F(ab')₂ против IgG (разведенного 1/30 в PBS/1% BSA). После выдерживания в течение 30 минут при комнатной температуре клетки промывали один раз 200 мкл PBS/BSA и выдерживали на льду вплоть до проведения анализа методом проточной цитометрии (EPICS XL-MCL, Coulter Electronics, Luton, UK). После этого регистрировали флуоресценцию среднего канала.

Среднюю величину флуоресценции на канал соотносили с величиной молекул IgG на клетку с использованием стандартной кривой, которую получали при добавлении 100 мкл 5% об/об клеток R₁R₁ к 900 мкл серийных 2-кратных разведений человеческого моноклонального IgG1 против D (BRAD-5). Сенсibilизированные эритроциты 3 раза промывали PBS/BSA и ресуспендировали в PBS/BSA до концентрации 1% об/об. Затем брали 25 мкл-аликвоты и анализировали методом проточной цитометрии, как описано выше. Оставшиеся эритроциты подсчитывали, центрифугировали с получением осадка, который

лизируют в буфере, содержащем Тритон X-100, и IgG, присутствующий в лизате, определяли с помощью ELISA, как описано Kumpel (Kumpel, В.М. (1990). A simple non-isotopic method for the quantitation of red cell-bound immunoglobulin. *Vox Sanguinis*, 59, 34-39). Число связанных молекул IgG на один эритроцит определяли исходя из концентрации и числа эритроцитов, от которых был получен каждый лизат. Затем строили стандартную кривую зависимости интенсивности флуоресценции от числа связанных молекул IgG на эритроцит.

Комплемент-зависимый лизис, опосредованный серией антител CAMPATH-1

100 мл венозной крови, взятой от здоровых доноров-волонтеров, дефибриновали и компоненты выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Plus (Pharmacia). Сыворотку и слои мононуклеарных клеток помещали в свежие пробирки. Эти клетки разводили в модифицированной по способу Дульбекко среде Искова (IMDM) и собирали путем центрифугирования. Эти клетки промывали два раза в IMDM, объединяя в один осадок, который ресуспендировали в 200 мкл IMDM. Затем добавляли 900 мкКи хромата натрия [⁵¹Cr] и клетки инкубировали при 37°C в течение 40 минут. Затем добавляли 10 мл IMDM и клетки осаждали. Эти клетки два раза промывали и ресуспендировали в IMDM при плотности приблизительно 6×10^6 клеток/мл. 50 мкл-аликвоты меченых клеток добавляли к образцам антител в 50 мкл IMDM в лунки 96-луночного планшета. В каждую лунку добавляли 100 мкл оставшейся сыворотки, разведенной 1:1 IMDM, и планшеты

инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Эти планшеты центрифугировали и брали образцы супернатантов, после чего относительные количества высвобожденного ^{51}Cr измеряли на γ -счетчике. Затем уровень спонтанного высвобождения, который был получен от образцов, к которым не было добавлено антитело, и величину полного количества ^{51}Cr , доступного для высвобождения, определяли из аналогичных образцов, взятых после ресуспендирования клеток. % специфического высвобождения ^{51}Cr вычисляли по следующей формуле:

$$\frac{(\text{количество образца} - \text{спонтанное количество}) \times 100}{(\text{общее количество} - \text{спонтанное количество})}$$

График средних значений и стандартных отклонений строили для трех повторностей образцов.

Для ингибирования комплемент-зависимого лизиса образцы антитела содержали постоянное количество (конечная концентрация 6,25 мкг/мл) CAMPATH-1 G1 и возрастающие количества CAMPATH-1 G2Δa.

ADCC, опосредованный серией антител CAMPATH-1

Мононуклеарные клетки периферической крови получали, как описано выше. После промывки эти клетки ресуспендировали в IMDM, в которую было добавлено 5% FBS, и переносили в колбу, сенсibilизированную антителами CD3. Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂ в течение трех дней. 5% этих клеток метили ^{51}Cr для использования в качестве клеток-мишеней, а затем промывали и ресуспендировали приблизительно при 6×10^5 клеток/мл в IMDM + 5% FBS. 50 мкл-аликвоты добавляли в лунки 96-луночных планшетов, содержащих 50 мкл образцов антител в

IMDM + 5% FBS. Клетки-мишени и антитела инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем добавляли эритроциты в качестве носителей и клетки осаждали. Эти клетки два раза промывали в IMDM. Оставшиеся моноклеарные клетки собирали путем центрифугирования и ресуспендировали при 4×10^6 клеток/мл в IMDM + 5% FBS и 150 мкл добавляли в каждую лунку в процессе ресуспендирования клеток-мишеней. Это давало отношение эффектор:мишень=20:1. Эти клетки аккуратно центрифугировали и помещали на 6 ч. в инкубатор для культивирования тканей. Затем брали образцы супернатанта и определяли специфическое высвобождение ^{51}Cr , как описано выше. После этого строили график средних значений специфического высвобождения для двух повторностей образцов в зависимости от конечной концентрации антител.

Пример 1 - Получение и основная оценка антител

Мутации, выбранные для элиминирования эффекторных функций, показаны в Таблице 1 (фиг. 15). Мутация Δa , внесенная в гены IgG1 и IgG2, вводит остатки IgG4 в положения 327, 330 и 331. Аналогичным образом, остатки IgG2 в положениях 233-236 были введены в IgG1 и IgG4, но поскольку IgG2 имеет делецию в положении 236, в котором иммуноглобулины других подклассов имеют глициновый остаток, то была сделана мутация, которая или не имела остатка в этом положении (Δb), или имела G236 (Δc).

Векторы, обеспечивающие экспрессию ДНК V_H CAMPATH-1 или Fog-1 в сочетании с генами дикого типа или генами мутантной константной области, котрансфецировали с соответствующими экспрессирующими векторами легкой цепи в клетки крысиной

миеломы.

Стабильные трансфектанты выделяли, размножали и антитела очищали из супернатанта на белок А-агарозе.

Отбирали антитело CAMPATH-1, поскольку оно представляет собой хорошую систему доставки к мишени для изучения комплемент- и клеточно-опосредованного лизиса *in vitro*.

Что касается антител Fog-1, то после очистки образовывался преципитат, но после его удаления путем стерилизующей фильтрации, какой-либо преципитации больше не наблюдалось. Концентрации Ab оценивали исходя из оптической плотности при 280 нм, и там, где это необходимо, в последующем они были скорректированы по данным ELISA, в котором были измерены относительные количества присутствующей к-цепи. Ab подвергали электрофорезу на восстанавливающем ПААГ с ДСН. Каждый образец давал две полосы с кажущимися молекулярными массами приблизительно 25 и 55 кДа, которые соответствовали ожидаемым размерам легкой и тяжелой цепей. Заметной разницы в размерах тяжелой цепи у Ab каждой серии не наблюдалось, однако, было отмечено, что у антител Fog-1 обе цепи были слегка меньше, чем у его CAMPATH-1-аналогов. Тот факт, что тяжелая цепь у антител каждой серии имеет, очевидно, одинаковые кажущиеся молекулярные массы, свидетельствует о том, что эти мутации не вызывают какого-либо заметного изменения в гликозилировании белков. Что касается Ab с CAMPATH-1-специфичностью, то выход после очистки варьировался от 0,6 до 9 мкг/мл супернатанта, тогда как выход растворимого Ab Fog-1 варьировался между 3 и 20 мкг/мл. При этом какой-либо

корреляции в ранжировании выходов после очистки для этих двух серий антител не наблюдалось, что позволяет предположить, что ни одна из этих мутаций не оказывает какого-либо воздействия ни на продуцирование Ab, ни на его способность связываться с белком А.

Затем была протестирована специфичность Ab этих двух серий. Было показано, что Ab CAMPATH-1 конкурирует с Ab CAMPATH-1 клинического класса в связывании идиотипического mAb против CAMPATH-1, YID13.9. Антитело Fog-1 оказалось способным к агглютинации эритроцитов RhD⁺ в присутствии антител против человеческих IgG как перекрестносшивающих реагентов. Аналогичным образом, подклассы IgG антитела Fog-1 были оценены путем сенсibilизации эритроцитов RhD⁺ различными Ab и путем наблюдения характера агглютинации с использованием антител против Glm(a), против IgG2 или против IgG4 в качестве перекрестносшивающих Ab. Полученный результат указывал на то, что эти антитела имели правильно идентифицированные подклассы. Затем проводили агглютинацию эритроцитов RhD⁺ с использованием антитела Fog-1 IgG1 и антитела против Glm(a), антитела Fog-1 IgG2 и антитела против IgG2, а также антитела Fog-1 IgG4 и антитела против IgG4 в присутствии избыточного количества Ab из серии CAMPATH-1. Антитела CAMPATH-1 были способны ингибировать агглютинацию путем конкурентного связывания с перекрестносшивающим реагентом, но только в том случае, когда они принадлежали к тому же подклассу, что и Ab Fog-1, в результате чего были проверены их подклассы.

Пример 2 - Связывание с FcγRI

Эритроциты, имеющие приблизительно 30000 RhD сайтов на клетку (R_2R_2), сенсibilизировали каждым из 11 Ab Fog-1 в определенном интервале концентраций и добавляли к трансфектантам B2KA, экспрессирующим Fc γ RI человека, культивируемым в лунках. После инкубирования избыточное количество эритроцитов отмывали и регистрировали процент клеток B2KA, которые образовывали розетки с эритроцитами (фиг.1). Для G1 и G1 Δ a в том случае, когда остатки IgG4 были включены в положения 327, 330 и 331, достигались аналогичные уровни образования розеток, причем, полумаксимальное образование розеток происходило тогда, когда эритроциты были сенсibilизированы Ab при концентрации около 0,1 мкг/мл, то есть концентрации, при которой Ab Fog-1 должно, как предполагалось, занимать одну треть RhD сайтов. Для достижения тех же самых уровней розеткообразования требовались немного более высокие концентрации G4. При использовании эритроцитов, сенсibilизированных антителами G1 и G4, содержащими мутации Δ b и Δ c, или антителом G2, образования розеток не наблюдалось. В эксперименте, проиллюстрированном на фиг.1, была протестирована более высокая сенсibilизирующая концентрация, которая составляла 10 мкг/мл, и которая, как предполагалось, соответствовала захватыванию приблизительно 90% RhD сайтов. Этот эксперимент повторяли с использованием концентраций, составляющих вплоть до 80 мкг/мл, которые, в основном, насыщают RhD сайты, но и в этом случае не наблюдалось образования розеток для G2 и для Ab, содержащих мутации Db или Dc и, тем самым, вводящих остатки IgG2 в нижнюю часть шарнирной области. Это свидетельствует о том, что даже когда эритроциты были

сенсibilизированы этими Ab при максимальной плотности для этого антигена, то этого было недостаточно для взаимодействия IgG/FcγRI с образованием розеток.

Было обнаружено, совместное центрифугирование сенсibilизированных эритроцитов и клеток B2KA перед наблюдением розеток на предметном стекле микроскопа дает более высокое количество розеток, чем инкубирование клеток в лунках, а поэтому этот метод был использован для исследования ингибирования образования розеток. Перед смешиванием с клетками B2KA эритроциты R₂R₂ сенсibilизировали смесью 1 мг/мл Fog-1 G1 и различных количеств Fog-1 G2Da или Fog-1 G4Db. В случае, когда 1 мкг/мл Fog-1 G1 использовали отдельно, то сенсibilизированные эритроциты образовывали розетки на 95% клеток B2KA, тогда как сенсibilизация в присутствии 64 мг/мл G2Δa или G4Δb полностью предотвращала образование розеток (данные не приводятся).

Связывание Ab из обеих серий с двумя другими клеточными линиями, которые экспрессируют кДНК FcγRI на своей поверхности, измеряли путем флуоресцентного окрашивания. Характерные эксперименты проиллюстрированы на фиг. 2. Уровень поверхностно экспрессированных FcγRI, зарегистрированный с использованием Ab CD64, был выше для трансфектантов 3Т3, чем для клеток линии B2KA, на что указывали более высокие уровни сигналов, полученные при измерении связывания посредством Fc. Для обеих серий связывание антител G1 и G1Δa с рецептором с одинаковой кажущейся аффинностью, указывало на то, что мутации в положениях 327, 330 и 331 не оказывают заметного влияния на

это взаимодействие. Уровень связывания Ab G4 был приблизительно в три раза ниже, чем уровень связывания антител G1 и G1Δa. Небольшой уровень связывания наблюдался для Ab G2 или любого из других мутантных Ab, что позволяет предположить, что мутации Δb и Δc в IgG1 и IgG4 являются достаточными для того, чтобы уменьшить уровень связывания с FcγRI, по крайней мере, в 10⁴ раз. При сравнении уровня флуоресценции с фоном или с уровнем флуоресценции для эквивалентного Ab, имеющего мутацию Δb, антитело, содержащее мутацию Δc, а в частности, G1Δc, обнаруживало небольшой уровень связывания с FcγRI при самой высокой тестируемой концентрации. При наложении гистограмм интенсивности флуоресценции друг на друга, как показано на фиг. 3, для самых высоких концентраций антител CAMPATH-1 и клеток B2KA, кривые для G1 и G1Δa совпадают. При этом наблюдается явное различие между гистограммами для антител G1Δb и G1Δc.

Пример 3 - Стимуляция FcγRI, измеренная с помощью хемилюминесценции

Для определения функциональной активности, опосредованной FcγRI/II, измеряли хемилюминесцентный (ХЛ) ответ моноцитов на эритроциты, сенсibilизированные антителами из серии Fog-1, и строили кривые зависимости от числа связанных молекул Ab на эритроцит (фиг. 4). Различия между антителами G1 и G1Δa наблюдались при более высоких количествах Ab, но оба они давали более высокие уровни ответа, чем Ab G4 в диапазоне концентраций Ab. Значительный уровень стимуляции достигался

для Ab G1Δс, и несколько меньший уровень достигался для G1Δас и G4Δс, тогда как другие Ab не давали никакого ответа.

Антитело, о котором, исходя из предыдущего описания, известно, что оно является дефицитным по стимуляции FcγRI, смешивали в возрастающих концентрациях с постоянным количеством Fog-1 G1 и использовали для сенсibilизации эритроцитов. ХЛ-ответ по отношению к эритроцитам показан на фиг. 5. При сравнении ХЛ-ответа с ответом, полученным при титровании лишь одного G1, очевидно, что шесть из восьми Ab ингибируют реакцию на том уровне, который был предсказан в предположении, что эти мутанты вытесняют активные G1 с эритроцитов пропорционально их относительным концентрациям. Для G2 ингибирующее действие замедляется так, что для достижения того же самого уровня ингибирования требуется в три раза большее количество G2. G1Δс обладает ингибирующей активностью приблизительно на том же самом уровне, что и другие мутанты, за исключением того, что эти ответы не снижаются до нуля.

Эффективность хемилюминесценции в прогнозировании тяжести *in vivo*-патологии обсуждается в двух работах Hadley (1995) Transfusion Medicine Reviews 9:302-313 и Hadley et al., (1998) Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:231-234.

В результате этих анализов было показано, что около 30% хемилюминесценции, продуцированной контрольным моноклональным антителом BRAD-5, должно быть прогностически значимым для *in vivo*-патологии при ГБН (гемолитической болезни новорожденных). Таким образом, эти антитела, которые обладают блокирующей

способностью на уровне ниже 30%, должны быть подходящими для терапии.

Одно из мутантных антител, Fog-1 G2Δa тестировали на его способность ингибировать ХЛ-реакцию в ответ на сыворотку, содержащую клинически значимое количество Ab. Эта сыворотка содержала Ab против RhD или Ab против C+D, и в отсутствии ингибитора давала ХЛ-ответ выше, чем 30% по этой шкале, что являлось показателем тяжелой гемолитической болезни новорожденного и требовало внутриматочной трансфузии. Эту сыворотку смешивали с различными концентрациями G2Δa, эти смеси использовали для сенсibilизации эритроцитов и измеряли ответы моноцитов (фиг. 6). Добавление Ab G2Δa приводило к снижению ХЛ-сигналов, обусловленных всеми пятью антисыворотками против RhD с отсечкой ниже 30%. Количество Ab, необходимое для достижения этого уровня, варьируется от 16 до 260 мкг/мл, то есть, в интервале, который, вероятно, отражает различные количества и аффинности анти-RhD Ab в сыворотке. Использовались две контрольные сыворотки. Антисыворотка против К вообще не может быть блокирована G2Δa, поскольку его реакционная способность направлена на другой антиген на эритроцитах. Лишь часть активности антисыворотки против C+D может быть ингибирована G2Δa.

Пример 4 - Активность в отношении комплемент-зависимого лизиса

На фиг. 7 показано, что все мутации, введенные в антитела G1 и в CAMPATH-1 G2, приводят к резкому снижению их способности опосредовать комплемент-зависимого лизиса. Анализ, проведенный с использованием постоянного количества G1 и

различных количеств G2Δa (фиг. 8), показал, что антитело G2Δa способно блокировать цитолиз МКПК под действием CAMPATH-1 G1.

Пример 5 - Активность в отношении ADCC

Способность опосредовать ADCC измеряли для антител CAMPATH-1 с использованием в качестве клеток-мишеней МКПК человека (фиг. 9), и для антител Fog-1 с использованием в качестве клеток-мишеней RhD⁺-эритроцитов (фиг. 10 и 10b). На фиг. 9 показана смешанная способность антител CAMPATH-1 опосредовать ADCC, причем, некоторые мутанты имели очень низкие активности. На фиг. 10 и 10b показано, что мутантные антитела Fog-1 G1Δab, G1Δac, G2Δa, G4Δb и G4Δc оказались неспособными поддерживать любой цитолиз эритроцитов. Как показано на фиг. 10, наблюдался некоторый уровень лизиса эритроцитов, сенсibilизированных G2 или G4, но эти антитела не обладали заметной активностью в анализе, проиллюстрированном на фиг. 10b. Это свидетельствует о том, что уровень лизиса может зависеть от донора эффекторных клеток и может даже варьироваться при использовании эффекторных клеток, взятых от того же самого донора в разное время. Однако, для вышеперечисленных мутантов не наблюдалось какой-либо активности, превышающей уровни фона, хотя были протестированы эффекторные клетки, взятые от различных доноров.

Некоторые из антител Fog-1 были использованы для испытания на ингибирование ADCC RhD⁺-эритроцитов антителом Fog-1 G1 (фиг. 11 и 11b) и клиническим образцом антисыворотки против-RhD (фиг. 12). Из этих графиков очевидно, что все протестированные антитела способны ингибировать ADCC при их

смешивании с активными антителами до сенсibilизации эритроцитов. Особенно эффективными в блокировании ADCC оказались мутантные антитела Fog-1 G1Δb, G1Δab, G1Δac, G4Δb и G4Δc.

Пример 6 - Связывание с FcγRII

На фиг. 13, 13b и 14 проиллюстрировано связывание комплексов антител из серии Fog-1 с клетками, несущими FcγRIIa 131H/H, FcγRIIa 131R/R и FcγRIIb1*, соответственно. Вследствие низкой аффинности отдельных молекул антител, для измерения связывания с этими рецепторами необходимо получить комплексы антител. FcγRIIa 131H/H представляет собой аллотип FcγRIIa, по отношению к которому, как предполагалось, антитела IgG2 обладают высокой аффинностью связывания, и действительно, G1 и G2 обнаруживали высокую степень связывающей активности (фиг. 13). Очевидно, что введение мутаций в эти два антитела приводит к постепенному уменьшению уровней связывания, и антитела G1Δc и G1Δac обнаруживали лишь фоновые уровни связывания, как показано антителом G4. На фиг. 13b показано, что эти антитела имеют разные относительные активности при связывании с аллотипом 131R FcγRIIa, но мутации, введенные в антитело G1 дикого типа, снова приводили к снижению уровня связывания с рецептором. Все эти антитела обнаруживали значительно более высокий уровень связывания с ингибирующим рецептором FcγRIIb1*, чем образцы негативного контроля перекрестносвязывающего F(ab')₂, взятого отдельно или в виде комплекса агликозилированного IgG1 с F(ab')₂ (фиг. 14). Хотя

уровень связывания с большинством мутантов снижался по сравнению с уровнем связывания соответствующих антител дикого типа, однако, некоторые мутанты обнаруживали связывающую активность, которая в два раза превышала связывающую активность, обнаруживаемую антителом G1 дикого типа.

Пример 6b - Связывание с FcγRIII

На фиг. 14b и 14c показано связывание комплексов антител из серии Fog-1 с клетками, несущими FcγRIIIb аллотипов NA1 и NA2, соответственно. Для обоих аллотипов наблюдалось связывание с антителом G1 и, в меньшей степени, с антителами G1Δa и G1Δc. Для других мутантных антител никакого связывания не наблюдалось, поскольку они обнаруживали уровни флуоресценции, аналогичные уровням образцов негативного контроля, содержащих лишь одни перекрестносвязывающиеся F(ab')₂ или агликозилированного антитела IgG1, образующего комплекс с F(ab')₂.

Пример 7 - Продуцирование антител против HPA-1a

V_H и V_L оцFv против HPA-1a (Griffin, H.M. & Ouwehand, W. H. (1995). A human monoclonal antybody specific for the leucine-33 form of the platelet glycoprotein IIIa from V gene phage display library. Blood 86, 4430-4436) были амплифицированы, и каждый из них был присоединен к лидерной последовательности от вектора M13VNPCR1 (Orlandy et al., 1989) посредством ПЦР с перекрывающимися удлинениями, как описано ранее. ДНК, 3'-конец V_H в M13VNPCR1 и соответствующий 5'-конец интрона V_H-C_H, аналогичным образом присоединяли к лидерной

последовательности/V_HДНК. Этот продукт клонировали в виде *HindIII-BamHI*-фрагмента в IgG1- и IgG2-экспрессирующий вектор для замены существующего фрагмента вариабельной области, в результате чего получали векторы pSVgptB2VNHuIgG1 и pSVgptB2VNHuIgG2.

Лидерную последовательность/V_HДНК присоединяли с сохранением рамки считывания к ДНК константной области λ -цепи человеческого антитела аллотипа Kern⁰Oz⁻ (Rabbitts, T.H., Forster, H. & Matthews, J.G. 1983, Mol. Biol. Med. 1:11), взятой из имеющегося экспрессирующего вектора (Routledge, E.G., Lloyd, I., Gorman, S.D., Clark, M & Waldman, H. 1991, Eur. J. Immunol., 21:2717). Весь ген λ клонировали в M13 в виде *HindIII-BamHI*-фрагмента и со стороны 5'-конца гена добавляли энхансер мышинной тяжелой цепи, взятый из pSVhyg-Hu κ C (Orlandi et al., 1989) с использованием адаптеров так, чтобы вся вставка могла быть перенесена в pSV2neo (Southern, P.J. & Berg. P. 1982. J. Mol. Appl. Genet. 1:327) в виде *BamHI*-фрагмента. Этот вектор обозначали pSVneoB2V λ Hu κ .

Экспрессирующие векторы трансфецировали в клеточную линию крысиной миеломы YB2/0, трансфектанты отбирали и антитело очищали, как описано выше. Эти антитела B2IgG1 и B2IgG2 были использованы в качестве контрольных антител.

После отбора предпочтительных нулевых константных областей, *HindIII-BamHI*-фрагмент B2VN может быть введен в экспрессирующие векторы, несущие соответствующие гены константных областей, для замены присутствующего фрагмента

вариабельной области. Экспрессирующие векторы тяжелой цепи могут быть затем трансфецированы совместно с pSVneoB2VλHuCλ в миеломные клетки, и антитела могут быть очищены для дальнейшего использования.

Пример 8 - Терапевтическое использование связывающей молекулы

Терапевтическая молекула настоящего изобретения может быть использована для лечения осложнений беременности, вызванных аллоиммунизацией HPA-1a, например, путем внутривенного введения этой молекулы беременной женщине, в результате чего эта молекула переносится через плаценту (например, посредством FcRn), обеспечивая доставку терапевтической дозы к плоду.

Альтернативным способом является прямое введение плоду чрескожно через выбранный пупочный сосуд. В настоящее время эту процедуру осуществляют в FAIT для проведения трансфузии совместимых тромбоцитов. Из-за короткого времени жизни тромбоцитов, введенных посредством трансфузии, эту процедуру можно повторять многократно в течение беременности. Существует, однако, опасность потери плода, и этот риск составляет 0,5% на процедуру. Однако, введение терапевтического антитела в плод имеет то преимущество, что в этом случае, вероятно, требуется гораздо меньшая доза, а поэтому комбинированный метод с использованием молекул настоящего изобретения в сочетании с трансфузией тромбоцитов может рассматриваться как первая стадия терапии. Этот способ позволяет снижать или исключить необходимость дополнительной трансфузии тромбоцитов перед родами.

Резюме

Активности антител систематизированы в Таблице 2 (фиг. 16). Как видно из таблицы, были продуцированы связывающие молекулы, которые обладают пониженной способностью к связыванию с FcγRI, FcγRIIa 131H/H, FcγRIIa 131 R/R, FcγRIIb NA1 и FcγRIIb NA2; не обладают способностью стимулировать хемилюминесценцию моноцитов; не могут опосредовать комплемент-зависимый лизис; и не обладают активностью в отношении ADCC. Однако, эти связывающие молекулы сохраняют способность связываться с ингибирующим рецептором FcγRIIb. Другие мутации, используемые ранее для подавления эффекторных функций, таких как удаление сайта гликозилирования в домене CH2, с получением агликозилированных антител, могут также приводить к элиминированию связывания с этим рецептором, которое может быть нежелательным.

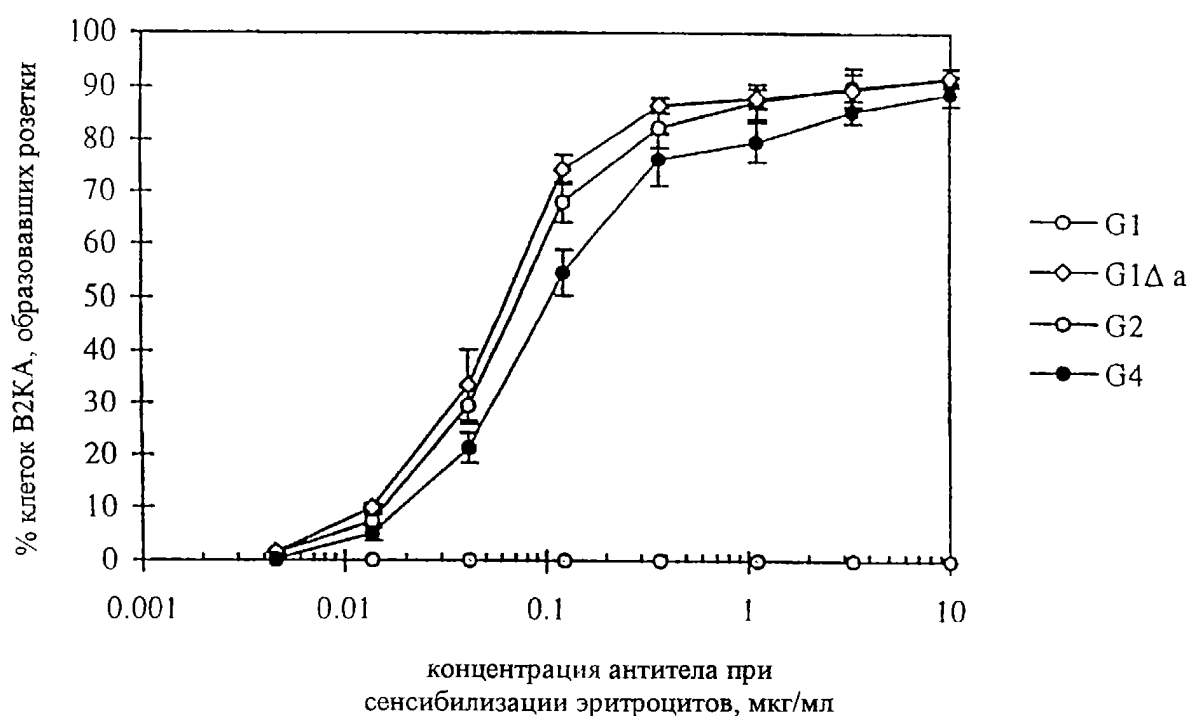
Было показано, что выбранные мутанты способны полностью ингибировать: образование розеток FcγRI-несущих клеток с помощью Fog-1 G1; ответ моноцитов на Fog-1 G1-сенсibilизированные эритроциты; ответ моноцитов на эритроциты, сенсibilизированные поликлональными антителами против RhD; цитолиз МКПК посредством комплемент-зависимого лизиса под действием CAMPATH-1 G1; цитолиз эритроцитов вследствие ADCC, опосредуемой Fog-1 G1; цитолиз эритроцитов вследствие ADCC, опосредуемой поликлональной антисывороткой против RhD.

Полученные результаты продемонстрировали, что замена даже одного остатка в домене CH2 IgG на соответствующий остаток иммуноглобулина другого подкласса может приводить к изменению

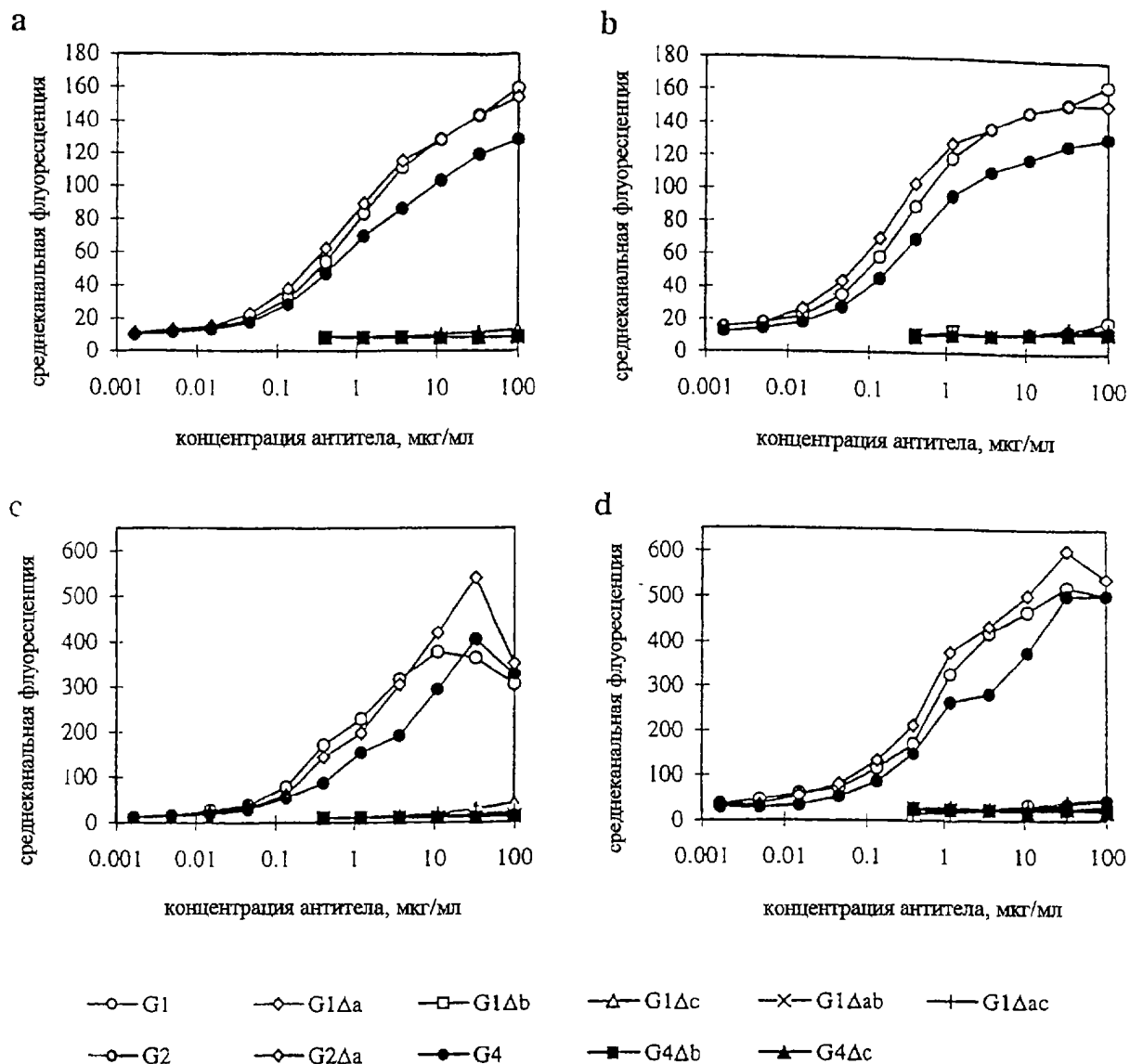
активности. Так, например, были получены три пары мутантов Db и Dc: G1Δb и G1Δc, G1Δab и G1Δac, G4Δb и G4Δc. В каждой паре антитела отличались только отсутствием (Δb) или присутствием (Δc) G236. Однако, для большинства определенных здесь функций, антитела Δb и Δc имели разные активности. Мутанты Db являются более активными при связывании с FcγRIIa 131H/H, тогда как мутанты Dc являются более активными при связывании с FcγRI, при связывании с FcγRIIIb NA1 и NA2, при активации моноцитов и активации ADCC. Участок, в который были введены мутации Δb и Δc, известен как нижняя шарнирная область или область шарнирного соединения и, вероятно, имеет удлинённую структуру, связывающую шарнирную область с остальным доменом CH2. Добавление или делеция остатка из этой области, вероятно, приводит к изменению первичной структуры остатков нижней шарнирной области в отношении сайтов взаимодействия с рецептором в остальной области домена CH2.

Однако, следует особо подчеркнуть, что влияние мутаций не всегда может быть предсказано исходя из активности антител дикого типа, но оно может зависеть от нового окружения (на основе "смешанных" подклассов IgG), в котором присутствует эта мутация. Одним из примеров является оценка комплемент-зависимого лизиса, где активность антитела IgG2 лишь примерно в три раза ниже, чем активность антитела IgG1, но введение остатков IgG2 в IgG1 (G1Δb и G1Δc) приводит к предотвращению этого лизиса. Аналогичным образом, IgG1 и IgG2 обладают одинаковой активностью связывания с FcγRIIa 131H, но

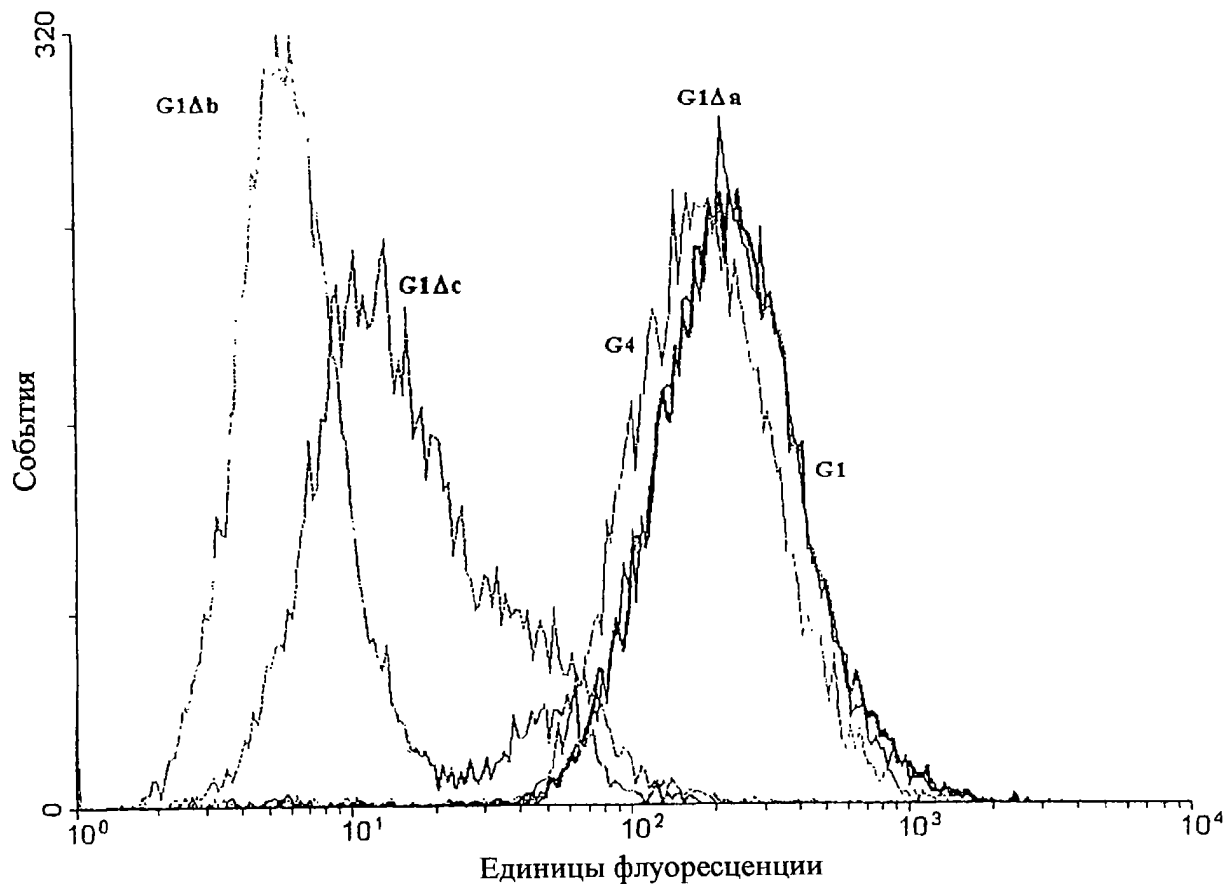
активности G1Δb и G1Δc в 50 и 10 раз ниже, соответственно. В анализе на ADCC, проиллюстрированном на фиг. 9 и 10, IgG2 и IgG4 обладают одинаково низкими, но измеримыми уровнями лизиса. Замена остатков между IgG2 и IgG4, а также введение замен в IgG1, приводит к снижению активности. Эти данные дают основание предположить, что антитела дикого типа других подклассов IgG человека и, вероятно, мутантные антитела могут использовать другие остатки при связывании с другими молекулами для стимуляции активности.



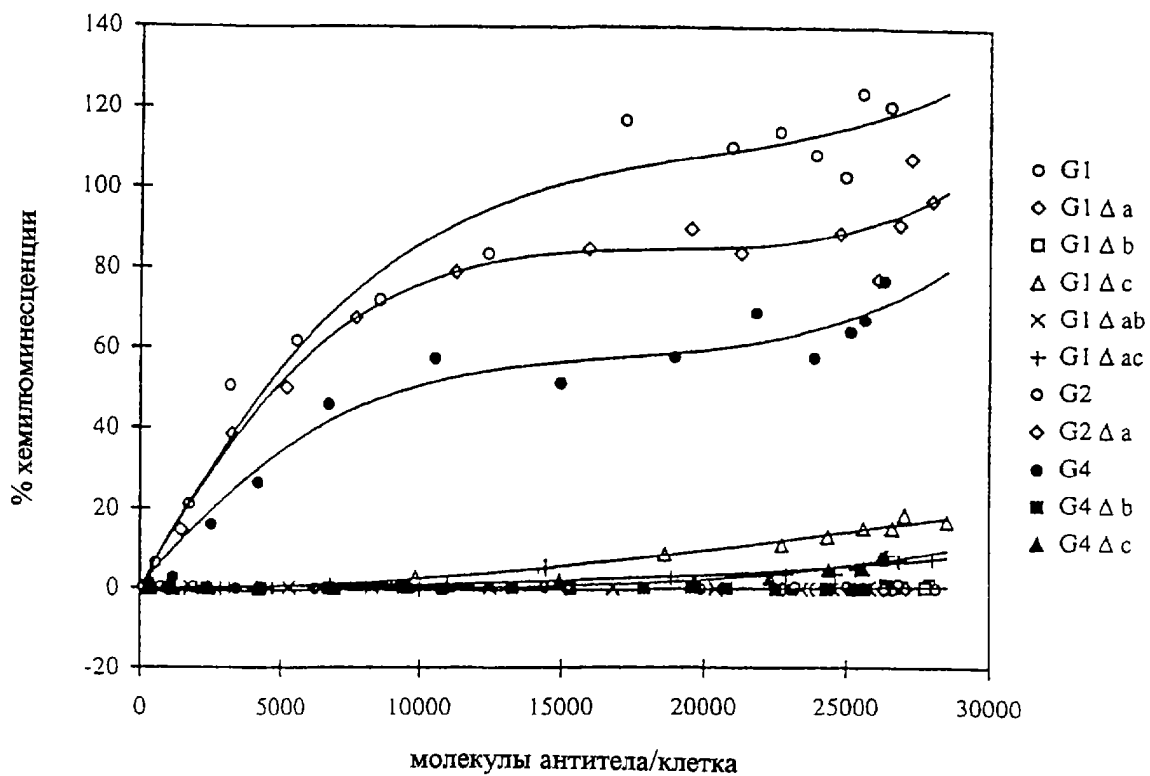
Фиг. 1



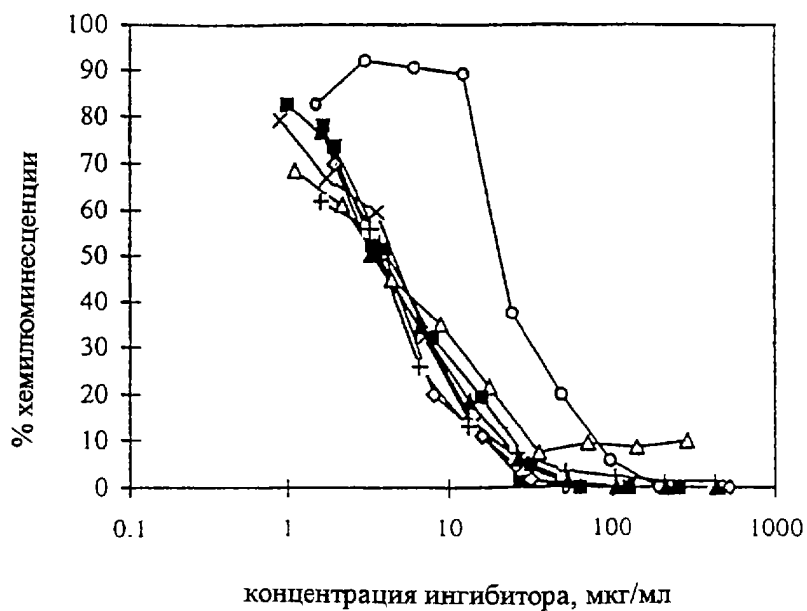
Фиг. 2



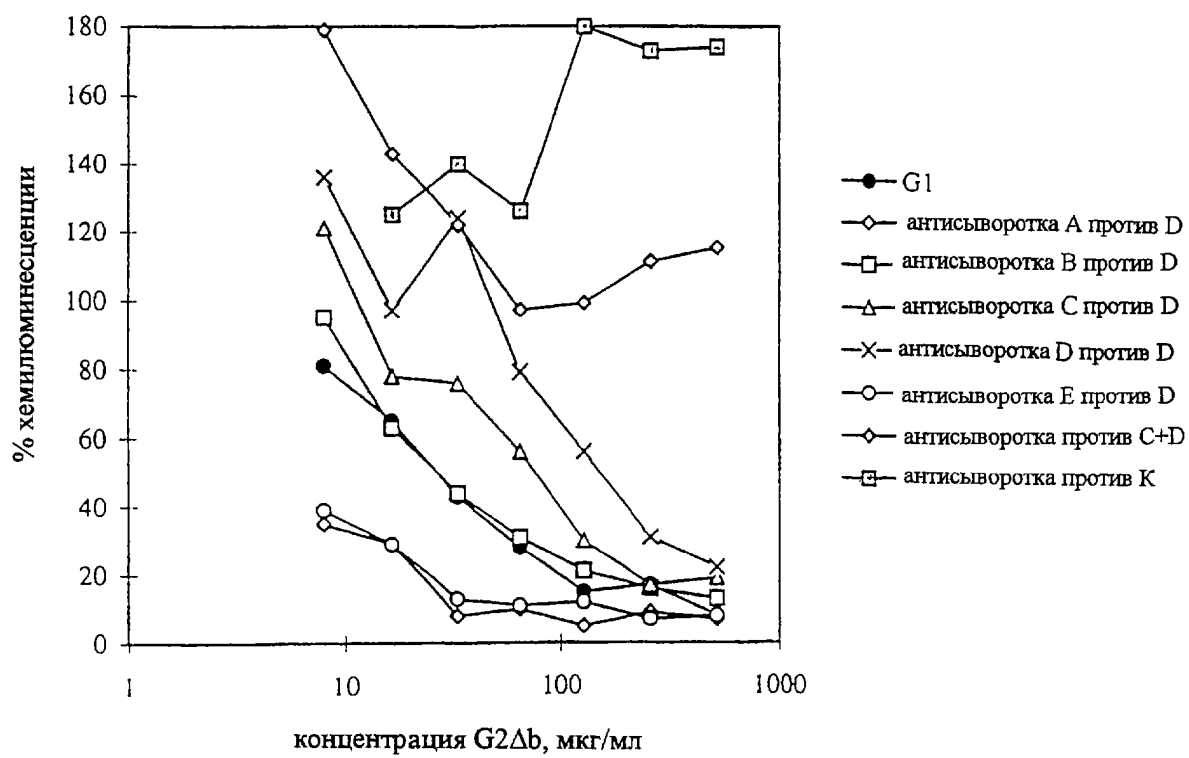
Фиг. 3



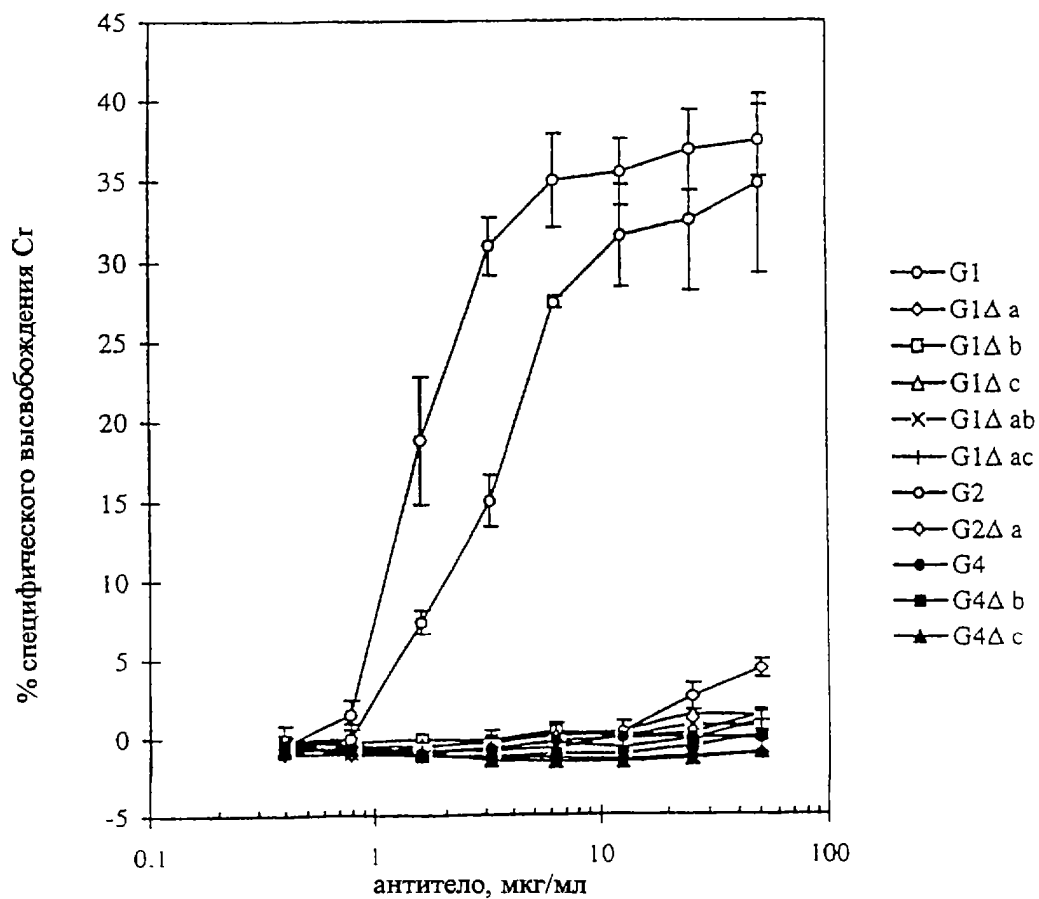
Фиг. 4



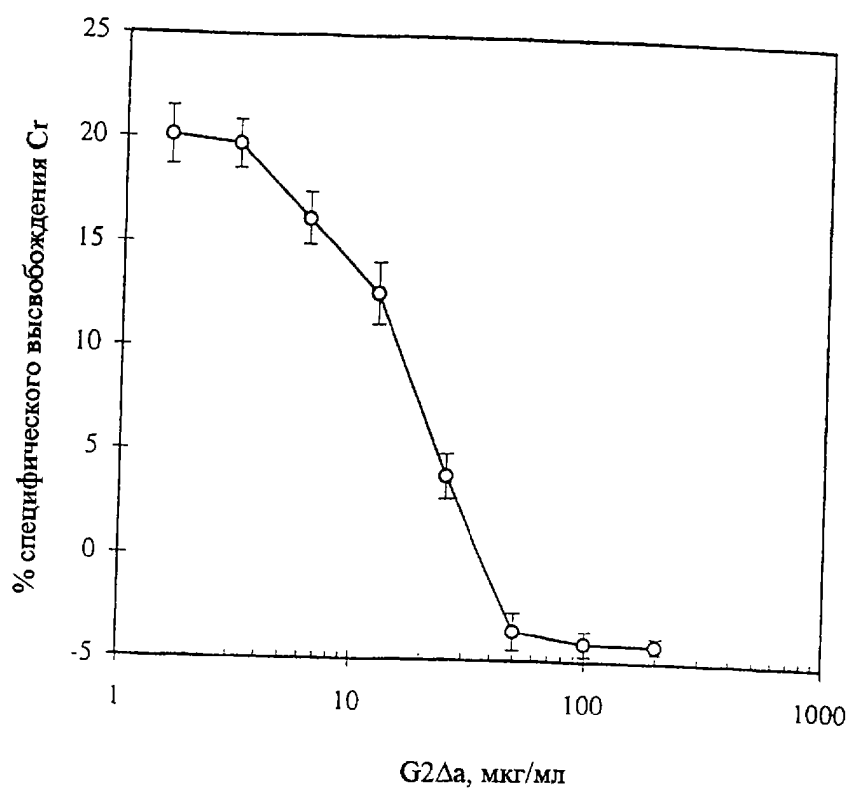
Фиг. 5



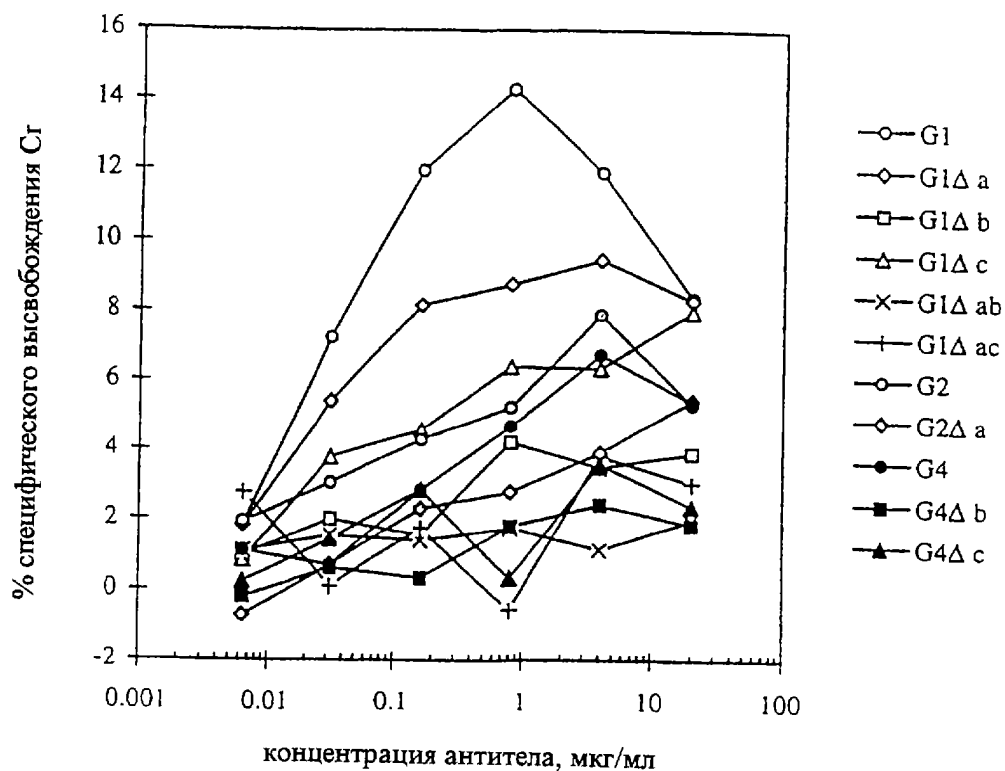
Фиг. 6



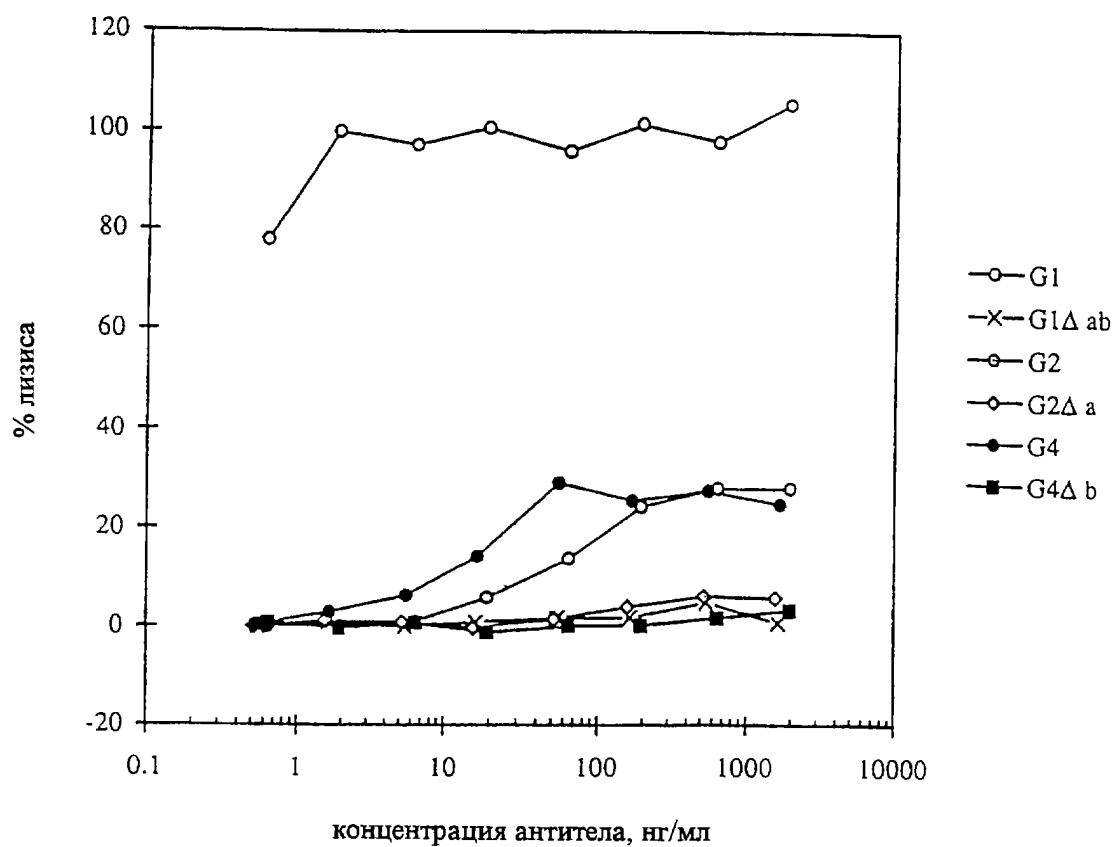
Фиг. 7



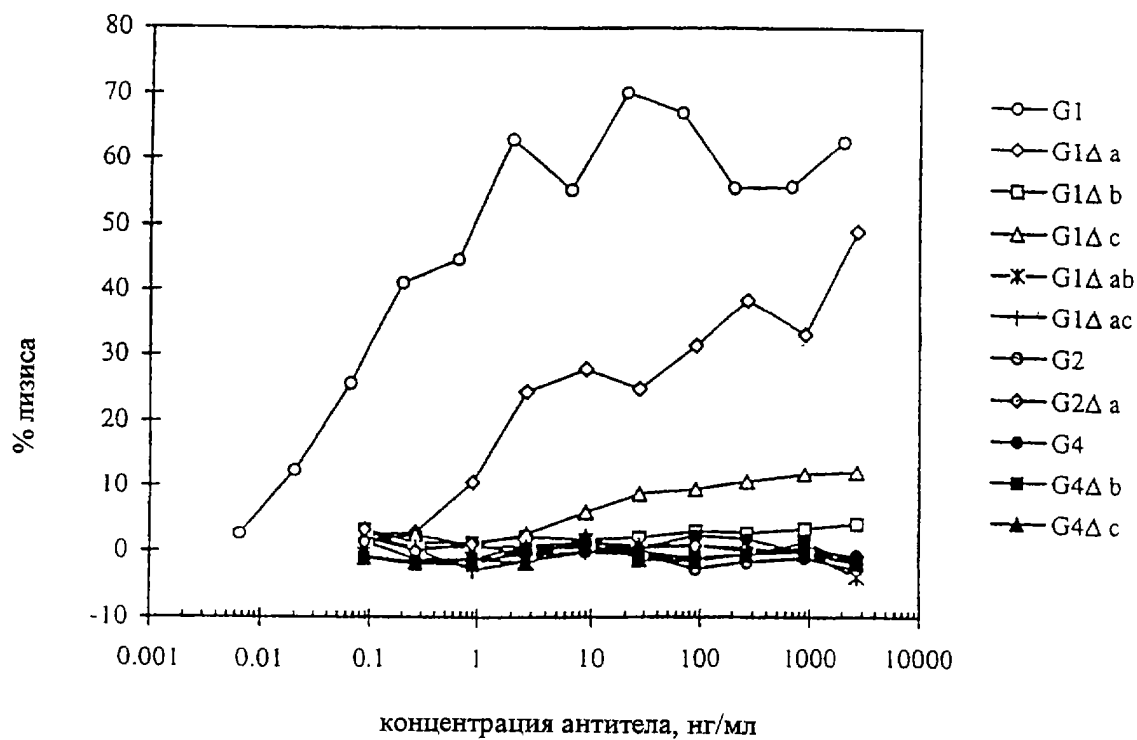
Фиг. 8



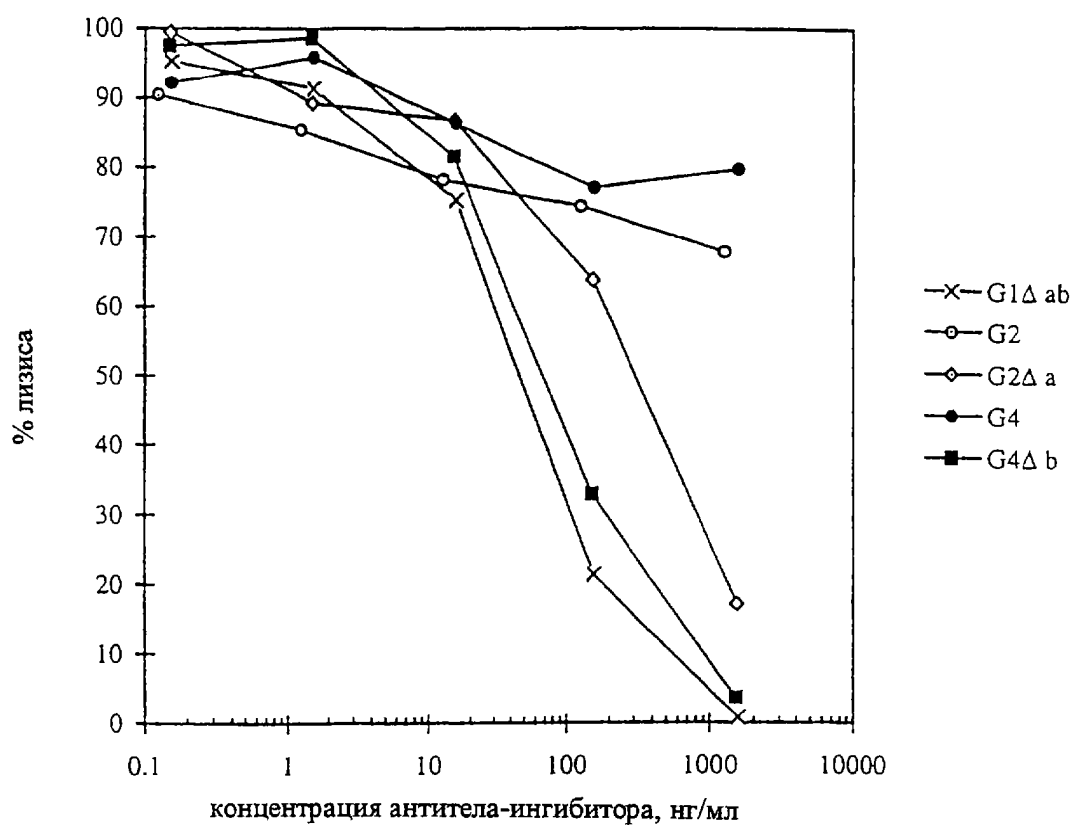
Фиг. 9



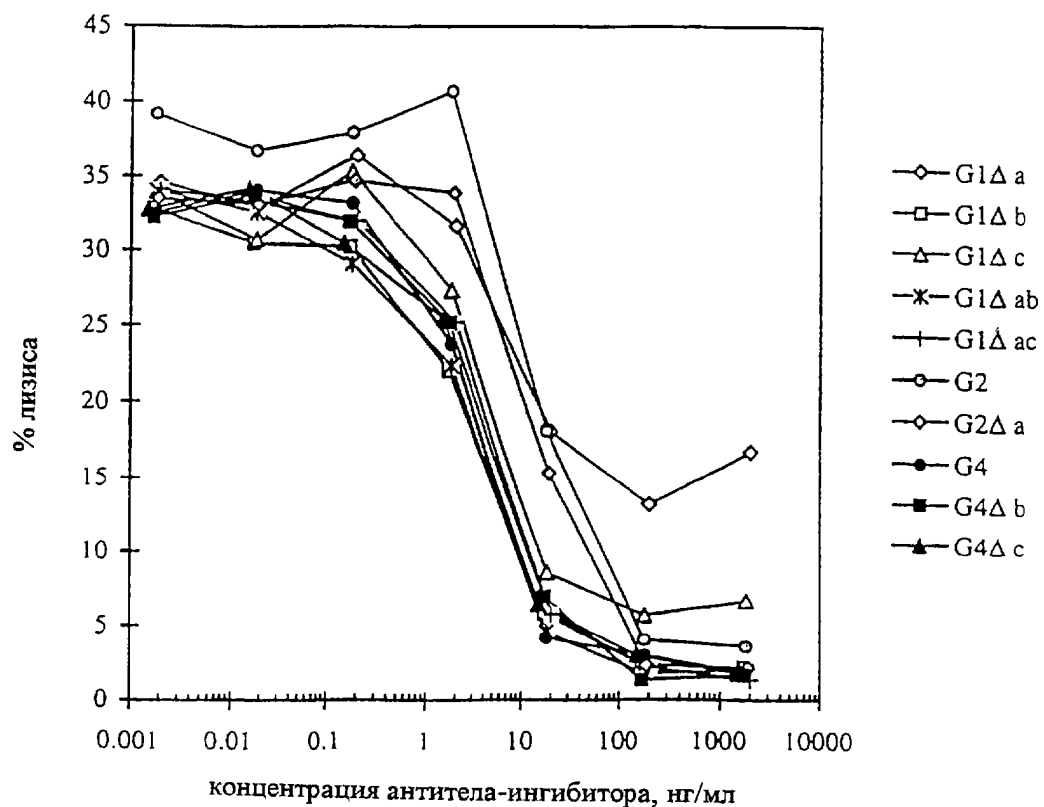
Фиг. 10а



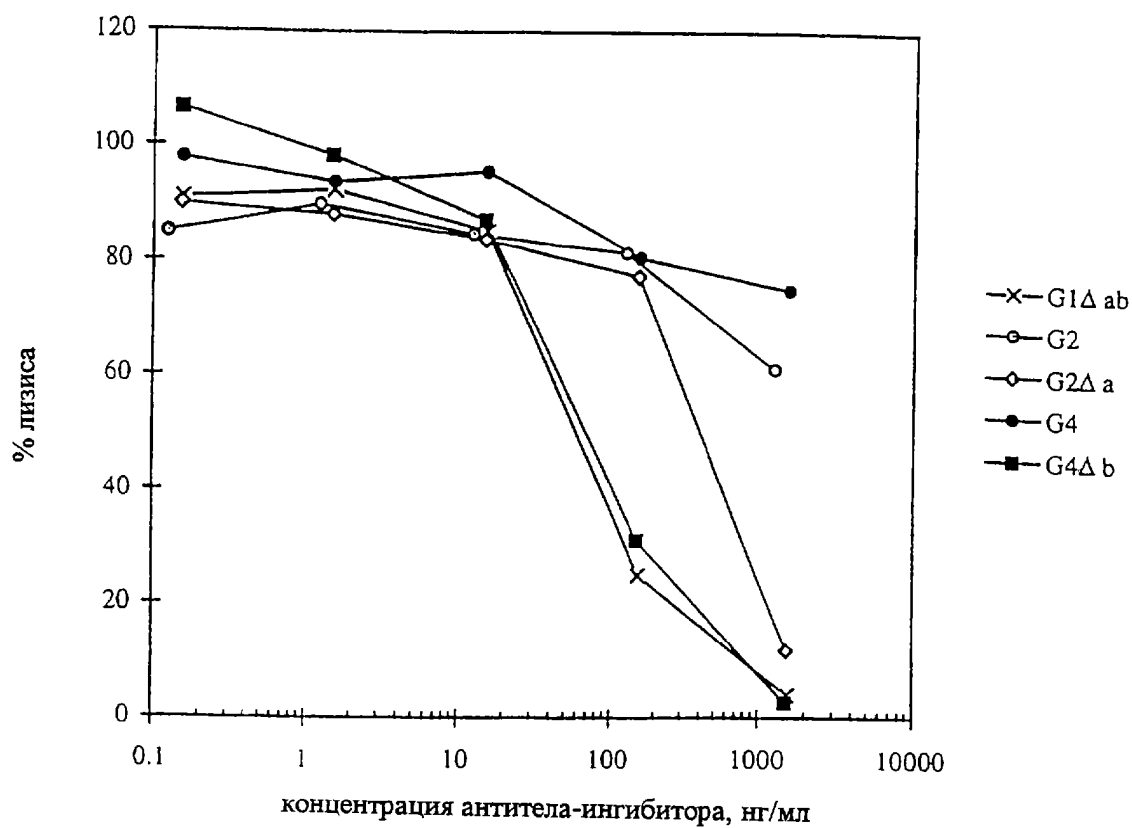
Фиг. 10b



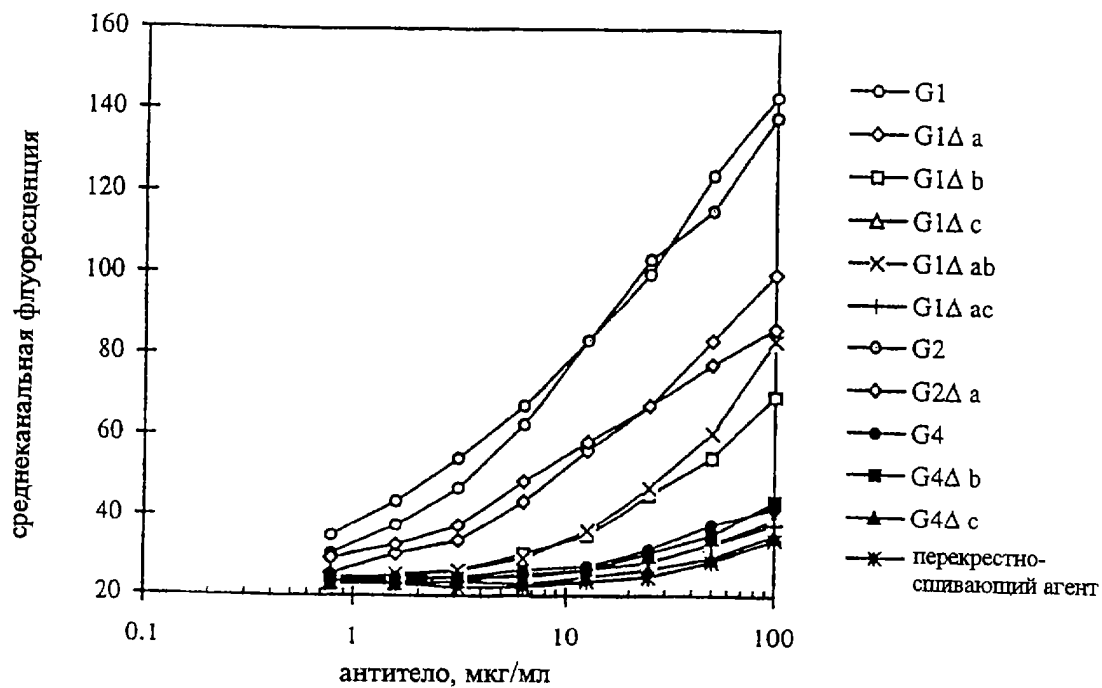
Фиг. 11a



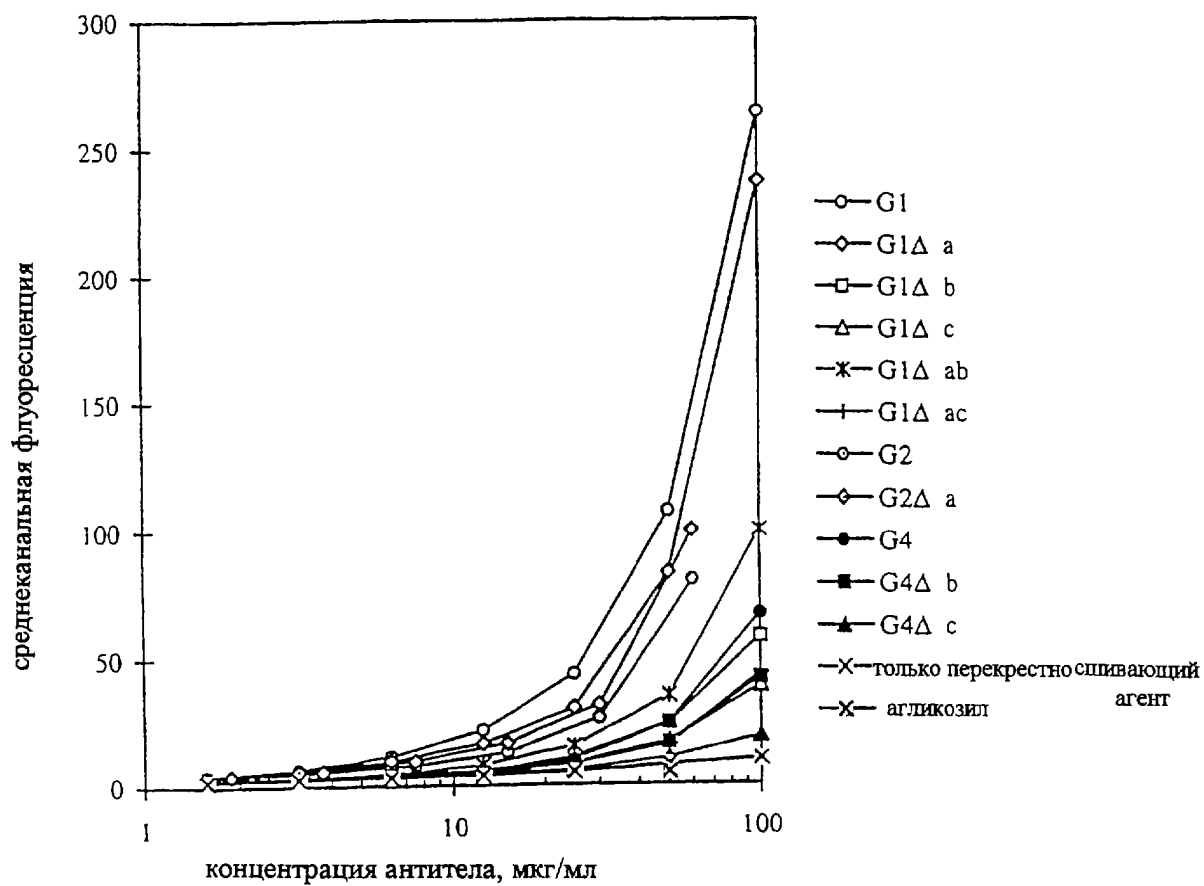
Фиг. 11b



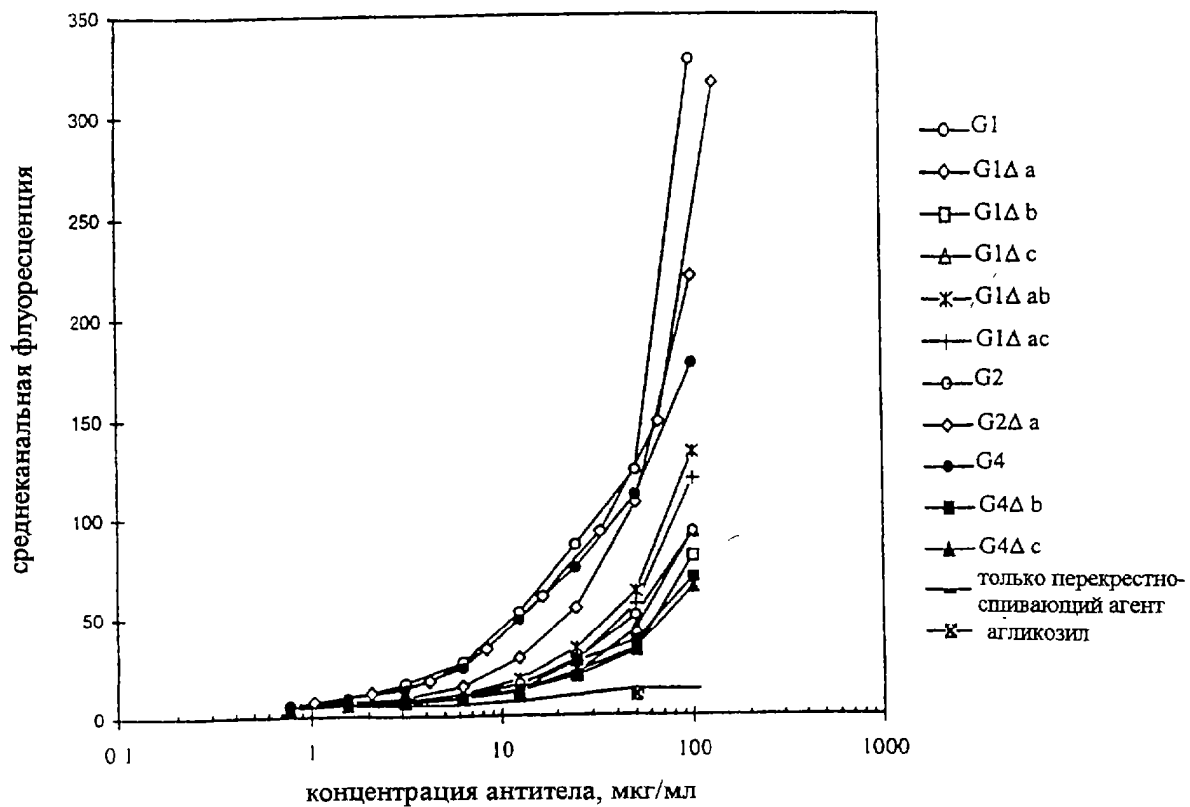
Фиг. 12



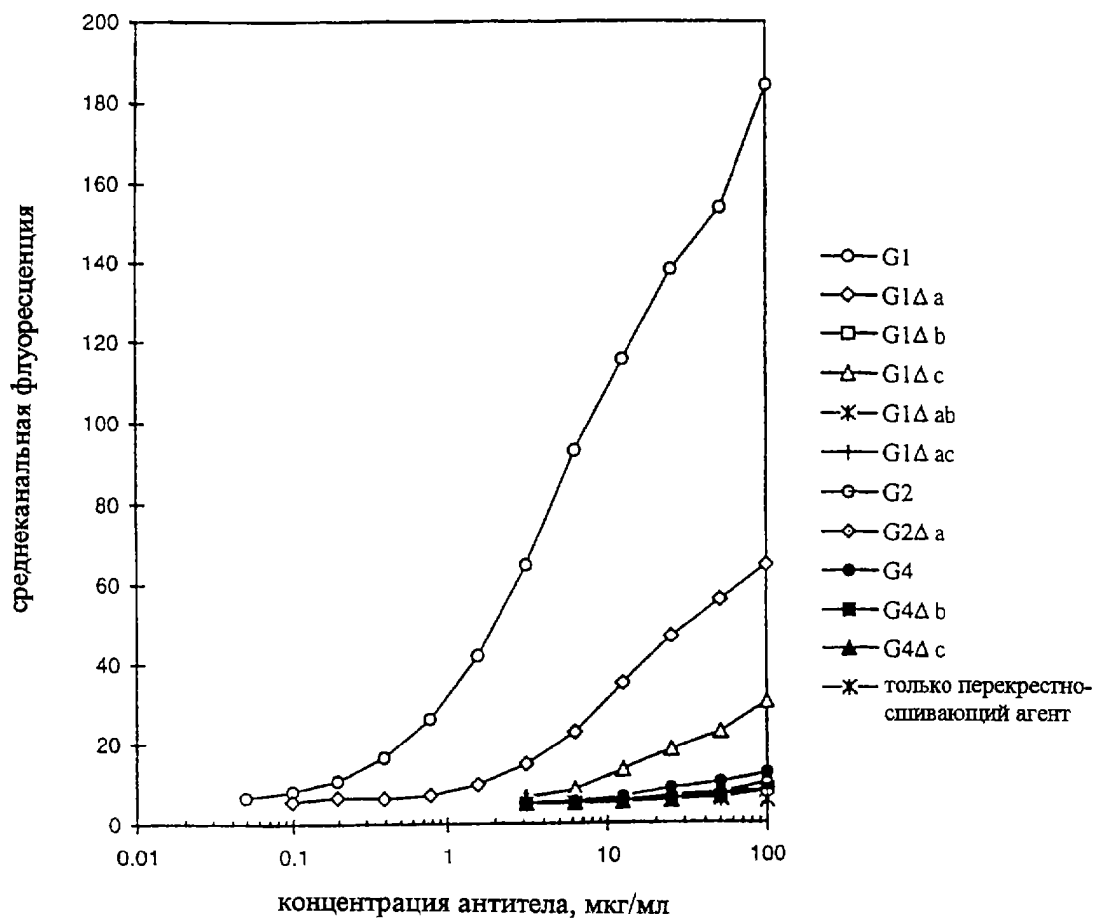
Фиг. 13а



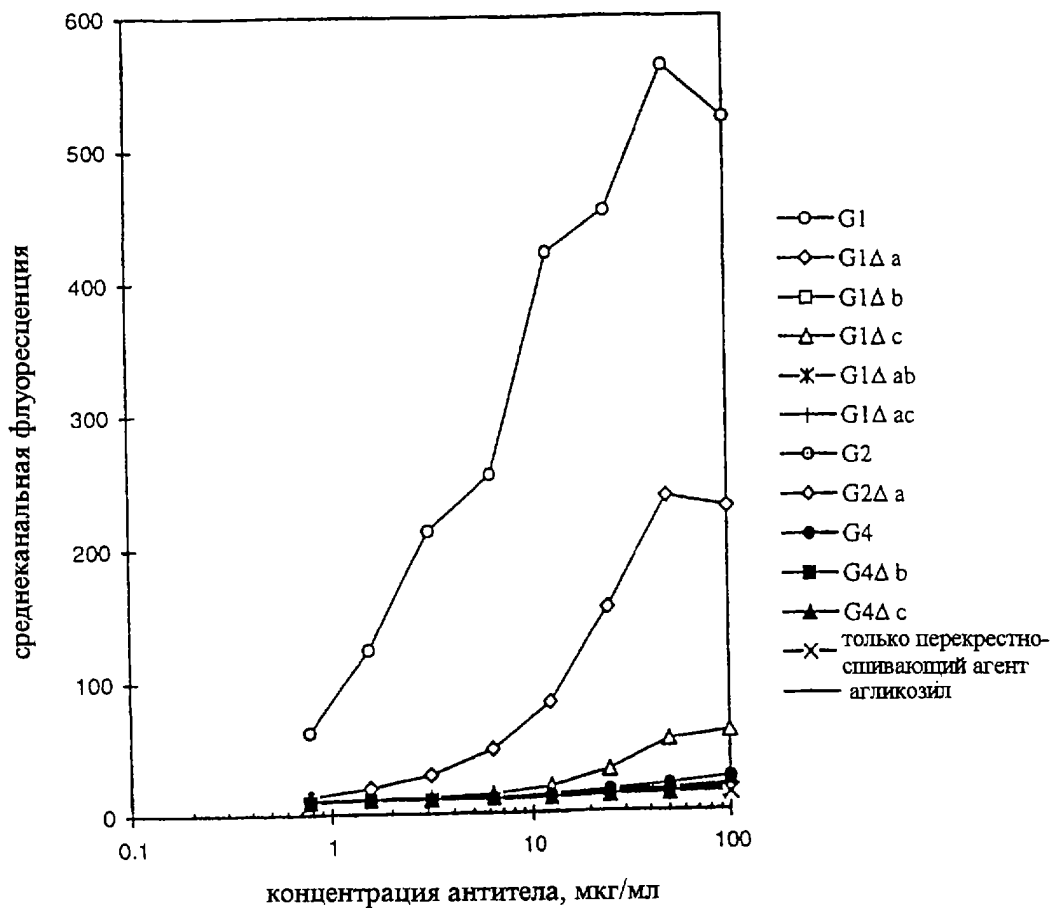
Фиг. 13б



Фиг. 14а



Фиг. 14б



Фиг. 14с

Сравнение мутаций, внесенных в антитела G1, G2 и G4 дикого типа

Антитело	233	234	235	236	327	330	331
G1	E	L	L	G	A	A	P
G1Δa	E	L	L	G	G	S	S
G1Δb	P	V	A	-	A	A	P
G1Δc	P	V	A	G	A	A	P
G1Δab	P	V	A	-	G	S	S
G1Δac	P	V	A	G	G	S	S
G2	P	V	A	-	G	A	P
G2Δa	P	V	A	-	G	S	S
G4	E	F	L	G	G	S	S
G4Δb	P	V	A	-	G	S	S
G4Δc	P	V	A	G	G	S	S

Фиг. 15

Аналитическая система	Серия	G1	G1Δa	G1Δb	G1Δc	G1Δab	G1Δac	G2	G2Δa	G4	G4Δb	G4Δc
FcγRI: образование розеток	F	+++	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-
FcγRI: флуоресц. окрашивание	C/F	+++	+++	-	-/+	-	-/+	-	-	++	-	-/+
FcγRIIa H/H: флуоресц. окрашив.	C/F	+++	++	+	-/+	+	-/+	+++	++	-/+	-/+	-
FcγRIIa R/R: флуоресц. окрашив.	F	+++	+++	+/-	+/-	+	+/-	++	++	+/-	+/-	-/+
FcγRIIb*: флуоресц. окрашив.	F	++++	++++	+	+	++	++	+	+++	+++	+	+
FcγRIIb NA1: образ. розеток	F	++	+	+/-	+/-	-/+	-/+	+/-	-	-	-	-
FcγRIIb NA1: флуоресц. окраш.	F	+++	++	-	+	-	-	-	-	+/-	-	-
FcγRIIb NA2: флуоресц. окраш.	F	+++	++	-	+	-	-	-	-	+/-	-	-
FcγRI/II: хемилюминесценция	F	+++	++	-	+/-	-	-/+	-	-	+	-	-/+
Лизис комплемента	C	+++	+/-	-/+	-/+	-/+	-/+	++	-	-	-	-
ADCC	C	+++	++	+/-	+	-	-/+	+	+/-	+	-	-/+
ADCC	F	++++	+++	+	++	-	-	+/-	-/+	+/-	-	-

Ингибитор. акт-сти G1 в анализе	Серия	G1	G1Δa	G1Δb	G1Δc	G1Δab	G1Δac	G2	G2Δa	G4	G4Δb	G4Δc
FcγRI: образование розеток	F								+		+	
FcγRI/II: хемилюминесценция	F			+++	++	+++	+++	+	+++		+++	+++
Лизис комплемента	C								+			
ADCC	F		-	++	+	++	++	-	+	-	++	++

Серия тестируемые антитела CAMPATH-1(C) или Fog-1 (F)
 +++, ++, + или + относительные уровни активности в анализе
 +/- низкий уровень активности, который значительно превышает фон
 +/- низкий уровень активности, который незначительно превышает фон
 - активность не превышает фон
 пропуск - не тестировали

Фиг. 16

Полные последовательности C_H2 родительских и мутированных антител

	233		252		296		318		327
	234		253				310		320
	235		254		297		311		322
	236								330
									331
G1	APRLLGGPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G2	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G3	APRLLGGPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G4	APRLLGGPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δa	APRLLGGPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δb	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δc	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
Seq 10 1	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δab	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δac	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
Seq 10 2	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δa	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δb	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								
G1Δc	APFVA_GPSVTLFPPKPKDTIMISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVBNKALPAPIEKTIISKAK								

Фиг. 17