

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034742**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.16

(21) Номер заявки
201300239

(22) Дата подачи заявки
2011.08.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К FAP, ПОЛИНУКЛЕОТИД, ВЕКТОР И КЛЕТКА ДЛЯ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **10172842.6**

(32) **2010.08.13**

(33) **EP**

(43) **2013.08.30**

(86) **PCT/EP2011/063648**

(87) **WO 2012/020006 2012.02.16**

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

(72) Изобретатель:
Бакак Марина, Фраймозер-Грундшобер Анне, Хоссе Ральф, Клайн Кристиан, Мёсснер Эккехард, Николини Валерия Г., Умана Пабло (CH)

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

(56) **WO-A1-2007077173**

US-A1-2003143229

MERSMANN M. ET AL.: "HUMAN ANTIBODY DERIVATIVES AGAINST THE FIBROBLAST ACTIVATION PROTEIN FOR TUMOR STROMA TARGETING OF CARCINOMAS", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, JOHN WILEY & SONS, INC, UNITED STATES, SWITZERLAND, GERMANY, vol. 92, no. 2, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 240-248, XP008049876, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/1097-0215(200102)9999:9999<, ::AID-IJC1170>, 3.0.CO;2-U, abstract; figures 1-8; tables I-III

WO-A2-2011020783

BAUM PATRICK ET AL.: "Single-chain Fv immunoliposomes for the targeting of fibroblast activation protein-expressing tumor stromal cells", JOURNAL OF DRUG TARGETING, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, DE, vol. 15, no. 6, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 399-406, XP008133377, ISSN: 1061-186X, the whole document

(57) Объектом изобретения является антитело, которое специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP) и содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 267, а также вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 265. Также описаны полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела и/или лёгкую цепь этого антитела, композиция для экспрессии его тяжелой и легкой цепи, а также соответствующий вектор и содержащая указанный полинуклеотид клетка-хозяин. Кроме того, данное изобретение относится к способу получения антитела, которое специфически связывает белок активации фибробластов (FAP), и его применению.

B1**034742****034742****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, специфическим в отношении белка активации фибробластов (FAP). Кроме того, изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим указанные антитела, и к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим указанные полинуклеотиды. Изобретение относится также к способам получения антител и способам их применения для лечения заболевания.

Предпосылки создания изобретения

Белок активации фибробластов (FAP) и антитела к FAP Человеческий белок активации фибробластов (FAP; GenBank, регистрационный номер AAC51668), известный также как сепраза, представляет собой ассоциированную с мембраной (интегральную мембранную) сериновую пептидазу с молекулярной массой 170 кДа (КФ 3.4.21.B28). Вместе с дипептидил-пептидазой IV (известной также как CD26; GenBank, регистрационный номер P27487), близкородственным расположенным на клеточной поверхности ферментом, и другими пептидазами FAP принадлежит к семейству дипептидилпептидаз IV (Yu и др., FEBS J 277, 2010, сс. 1126-1144). Он представляет собой гомодимер, содержащий две N-гликозилированных субъединицы с крупным С-концевым внеклеточным доменом, в котором локализован каталитический домен фермента (Scanlan и др., Proc Natl Acad Sci USA 91, 1994, сс. 5657-5661). FAP в его гликозилированной форме обладает как пост-пролилдипептидилпептидазной, так и желатиназной активностью (Sun и др., Protein Expr Purif 24, 2002, сс. 274-281).

Человеческий FAP впервые был идентифицирован в культуре фибробластов с помощью моноклонального антитела (MAт) F19 (описано в WO 93/05804, ATCC номер HB 8269). Гомологи этого белка обнаружены у некоторых видов, включая мышей (Niedermeyer и др., Int J Cancer 71, 1997, сс. 383-389), Niedermeyer и др., Eur J Biochem 254, 1998, сс. 650-654; GenBank, регистрационный номер AAN19190). FAP отличается уникальным распределением в тканях: обнаружена высокая повышающая регуляция его экспрессии на реактивных стромальных фибробластах в более чем 90% всех случаев первичных и метастатических эпителиальных опухолей, включая карциномы легкого, колоректальные карциномы, карциномы мочевого пузыря, яичника и молочной железы, при этом он, как правило, отсутствует в здоровых тканях взрослых индивидуумов (Rettig и др., Proc Natl Acad Sci USA 85, 1988, сс. 3110-3114; Garin-Chesa и др., Proc Natl Acad Sci USA 87, 1990, сс. 7235-7239). В более поздних исследованиях было установлено, что FAP экспрессируется не только в стромальных фибробластах, но также в некоторых типах злокачественных клеток эпителиального происхождения, и что экспрессия FAP прямо коррелирует со злокачественным фенотипом (Jin и др., Anticancer Res 23, 2003, сс. 3195-3198).

Благодаря его экспрессии при многих часто встречающихся типах рака и его ограниченной экспрессии в здоровых тканях, FAP рассматривался как перспективная антигенная мишень для визуализации, диагностирования и терапии различных карцином. Так, получено множество моноклональных антител к FAP, которые можно применять для исследовательских, диагностических и терапевтических целей.

Сибротузумаб/BIBN1 представляет собой гуманизированную версию антитела F19, которая специфически связывается с человеческим FAP (она описана в WO 99/57151), и были разработаны другие гуманизированные или полностью человеческие антитела к антигену FAP с эпипной специфичностью, характерной для F19 (они описаны у Mersmann и др., Int J Cancer 92, 2001, сс. 240-248; Schmidt и др., Eur J Biochem 268, 2001, сс. 1730-1738; WO 01/68708). Антитело OS4 представляет собой другую гуманизированную (с трансплантированными CDR) версию антитела F19 (Wuest и др., J Biotech 92, 2001, сс. 159-168), при этом scFv 33 и scFv 36 обладают специфичностью связывания, отличной от специфичности, характерной для F19, и дают перекрестную реакцию с человеческим и мышинным белком FAP (Brocks и др., Mol Med 7, 2001, сс. 461-469). Позднее были разработаны другие мышинные антитела к FAP, а также их химерные и гуманизированные версии (WO 2007/077173, Ostermann и др., Clin Cancer Res 14, 2008, сс. 4584-4592).

Протеазы в строме опухоли посредством протеолитического расщепления компонентов внеклеточного матрикса (ECM) облегчают такие процессы, как ангиогенез и/или миграция опухолевых клеток. Кроме того, строма опухоли играет важную роль в снабжении опухолей питательными веществами и кислородом, а также в инвазии и метастазах опухоли. Эти важные функции делают ее не только диагностической, но также и потенциальной терапевтической мишенью.

Данные, подтверждающие возможность направленного воздействия на строму опухоли *in vivo* с помощью антител к FAP, получены на фазе I клинического испытания с использованием меченного с помощью ¹³¹I антитела F19, которые продемонстрировали специфическое обогащение опухолей антителом и возможность обнаружения метастазов (Welt и др., J Clin Oncol 12, 1994, сс. 1193-1203). Аналогично этому на фазе I испытания сибротузумаба продемонстрировано специфическое накопление в опухоли меченного с помощью I антитела (Scott и др., Clin Cancer Res 9, 2003, сс. 1639-1647). Однако ранняя фаза II испытания неконъюгированного сибротузумаба на пациентах с метастатическим колоректальным раком была прекращена из-за отсутствия эффективности антитела в отношении ингибирования развития опухолей (Hofheinz и др., Onkologie 26, 2003, сс. 44-48). Кроме того, позднее разработано антитело к FAP, у которого не обнаружено противоопухолевое действие *in vivo* при применении в неконъюгированной форме (WO 2007/077173).

Таким образом, сохраняется потребность в улучшенных терапевтических подходах, включая при-

менение для лечения различных типов рака антител с повышенной эффективностью, мишенью которых является FAP.

Гликозилирование антител

Олигосахаридный компонент может оказывать существенное влияние на свойства, имеющие отношение к эффективности терапевтического гликопротеина, включая физическую стабильность, устойчивость к воздействию протеаз, взаимодействия с иммунной системой, фармакокинетические параметры и специфическую биологическую активность. Указанные свойства могут зависеть не только от присутствия или отсутствия олигосахаридов, но также от их специфических структур. Можно сделать определенные обобщения, касающиеся взаимосвязи между структурой олигосахарида и функцией гликопротеина. Например, некоторые структуры олигосахарида опосредуют быстрый клиренс гликопротеина из кровотока в результате взаимодействий со специфическими связывающими углеводы белками, а другие могут связываться антителами и запускать нежелательные иммунные реакции (Jenkins N. и др., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Антитела IgG1-типа, которые являются наиболее часто применяемыми в противораковой иммунотерапии антителами, представляют собой гликопротеины, которые имеют консервативный N-связанный сайт гликозилирования на Asn 297 в каждом CH2-домене. Два сложных биантенных олигосахарида, присоединенных к Asn297, располагаются между CH2-доменами, формируя обширные контакты с полипептидным каркасом, и их присутствие является важным для того, чтобы антитело могло осуществлять эффекторные функции, такие как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) (Lifely M.R. и др., *Glycobiology* 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. и др., *Immunol. Rev.* 163, 1998, сс. 59-76; Wright A. и Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 1997, сс. 26-32).

Опыты по конструированию белков позволили установить, что FcγR взаимодействуют с нижней шарнирной областью CH2-домена IgG (Lund и др., *J. Immunol.* 157, 1996, сс. 4963-4969). Однако для связывания FcγR также требуется присутствие олигосахаридов, ковалентно связанных с консервативным Asn 297 в CH2-области. В работах Lund и др., *J. Immunol.* 157, 1996, сс. 4963-4969 и Wright и Morrison, *Trends Biotech.* 15, 1997, сс. 26-31 выдвинуто предположение о том, что либо олигосахарид и полипептид оба непосредственно присутствуют в сайте связывания, либо олигосахарид требуется для поддержания активной конформации полипептида CH2. Таким образом, в качестве средства повышения аффинности взаимодействия между IgG1 и FcγR и для повышения ADCC-активности IgG1 можно применять модификацию структуры олигосахарида.

Одним из путей достижения значительного увеличения эффективности моноклональных антител является повышение их естественных клеточноопосредуемых эффекторных функций путем конструирования их олигосахаридного компонента согласно методу, описанному у Umana и др., *Nat Biotechnol* 17, 1999, сс. 176-180 и в US № 6602684 (WO 99/54342), содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Umana с соавторами продемонстрировали, что сверхэкспрессия β(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), т.е. гликозилтрансферазы, катализирующей образование бисекционных олигосахаридов в клетках яичника китайского хомячка (CHO), значительно повышает ADCC-активность *in vitro* антител, продуцируемых в этих клетках. Сверхэкспрессия GnTIII в продуктивных клеточных линиях приводит к получению антител, обогащенных бисекционными олигосахаридами, которые, как правило, являются нефукозилированными и относятся к гибриднему типу. Если в продуктивных клеточных линиях в дополнение к GnTIII происходит сверхэкспрессия маннозидазы II (ManII), то образуются антитела, обогащенные бисекционными нефукозилированными олигосахаридами комплексного типа (Ferrara и др., *Biotechn Bioeng* 93, 2006, сс. 851-861). Оба типа антител обладают в значительной степени усиленной ADCC по сравнению с антителами с немодифицированными гликанами, однако только антитела, в которых большинство N-гликанов относятся к комплексному типу, обладают способностью значительно увеличивать комплементзависимую цитотоксичность (Ferrara и др., *Biotechn Bioeng* 93, 2006, сс. 851-861). Изменения в составе связанного с Asn 297 углевода или его элиминация также влияют на связывание Fc-домена антитела с Fcγ-рецептором (FcγR) и белком C1q системы комплемента, что является важным для ADCC и CDC соответственно (Umana и др., *Nat Biotechnol* 17, 1999, сс. 176-180; Davies и др., *Biotechnol Bioeng* 74, 2001, сс. 288-294; Mimura и др., *J Biol Chem* 276, 2001, сс. 45539-45547; Radaev и др., *J Biol Chem* 276, 2001, сс. 16478-16483; Shields и др., *J Biol Chem* 276, 2001, сс. 6591-6604; Shields и др., *J Biol Chem* 277, 2002, сс. 26733-26740; Simmons и др., *J Immunol Methods* 263, 2002, сс. 133-147).

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белком активации фибробластов (FAP), обладающим высокой аффинностью и/или повышенной эффекторной функцией.

Одним из объектов изобретения является антитело, которое специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), которое содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 267, и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 265.

Указанное антитело может содержать Fc-область или область, эквивалентную Fc-области иммуно-

лобулина, причем предпочтительно эта область представляет собой Fc-область IgG.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения это антитело представляет собой полно-размерное антитело класса IgG.

Оно может содержать константную область человеческого антитела или даже в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения оно представляет собой человеческое антитело.

Предпочтительно указанное антитело содержит созданную с помощью гликоинженерии Fc-область, причем указанное антитело имеет повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области по сравнению с антителом, созданным без применения гликоинженерии. При этом возможно, что по меньшей мере от примерно 20 до примерно 100% N-связанных олигосахаридов в указанной Fc-области являются нефукозилированными.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет повышенное относительное содержание олигосахаридов в указанной Fc-области, которые являются бисекционными благодаря N-ацетилглюкозамину (GlcNAc), по сравнению с антителом, созданным без применения гликоинженерии. Причем в нем по меньшей мере от примерно 20 до примерно 100% N-связанных олигосахаридов в указанной Fc-области могут быть бисекционными, более предпочтительно по меньшей мере от примерно 20 до примерно 50% N-связанных олигосахаридов в указанной Fc-области являются бисекционными благодаря GlcNAc и нефукозилированными.

Указанное антитело обладает повышенной эффекторной функцией и/или повышенной аффинностью связывания с Fc-рецептором, причем указанная повышенная эффекторная функция представляет собой повышенную ADCC.

Еще объектами данного изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела и/или легкую цепь предложенного антитела и композиция для экспрессии тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, которая содержит первый выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 267, и второй выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 265.

В заявке также описан вектор для экспрессии тяжелой цепи антитела и/или легкой цепи антитела, содержащий указанные полинуклеотиды и клетка-хозяин для получения антитела, содержащая полинуклеотиды, композицию или вектор.

Причем в предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин дополнительно включает один или более полинуклеотидов, содержащих последовательность, которая кодирует полипептид, обладающий активностью β -(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII). Причем полипептид, обладающий GnTIII-активностью, может представлять собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII и домен локализации маннозидазы II (ManII) в комплексе Гольджи.

Еще в одном предпочтительном варианте указанная клетка-хозяин может дополнительно включать полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид, обладающий маннозидазной II ManII-активностью.

Кроме того, изобретение относится к способам получения антитела, которое специфически связывает белок активации фибробластов (FAP), один из которых включает культивирование клетки-хозяина в среде и в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела, и выделение антитела, а второй - культивирование клетки-хозяина в среде и в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела, и модификацию олигосахаридов, присутствующих в Fc-области антитела, с помощью полипептида, который обладает GnTIII-активностью, и выделение антитела.

Объектами данного изобретения являются также и антитело, которое специфически связывается с FAP, полученное вышеуказанными способами и конъюгат антитела с цитотоксическим агентом для лечения рака.

Предложенное в заявке изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

В предпочтительном варианте она содержит также противораковое средство.

Кроме того объектом описанного в данной заявке изобретения являются применение антитела для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP, предпочтительно рака; применение антитела для приготовления лекарственного средства, предназначенного для индукции лизиса опухолевой клетки или стромальной клетки опухоли, в предпочтительном варианте индуцируемый антителом лизис клеток зависит от цитотоксичности антитела.

Еще одним из объектов является способ лечения индивидуума, страдающего заболеванием, которое отличается экспрессией FAP, который включает введение индивидууму в эффективном количестве антитела или фармацевтической композиции. Предпочтительно индивидууму вводят также дополнительное лекарственное средство, которое представляет собой противораковое средство. Причем указанное заболевание может представлять собой рак.

Описанное в заявке изобретение относится, кроме того, к способу индукции клеточного лизиса опухолевой клетки или стромальной клетки опухоли, который включает контактирование опухолевой клетки или стромальной клетки с антителом.

Причем указанный клеточный лизис предпочтительно индуцируется антителозависимой цитотоксичностью антитела.

Наконец последним объектом данного изобретения является способ диагностирования рака или воспалительного состояния у индивидуума путем определения комплекса диагностического агента и FAP. Он включает введение индивидууму в эффективном количестве диагностического агента, где указанный диагностический агент содержит антитело и метку, которая позволяет выявлять комплекс, включающий диагностический агент и FAP.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные методом резонанса поверхностного плазмона (SPR), для Fab-фрагментов антител к FAP с созревшей аффинностью. Представлены обработанные наборы кинетических данных для клона 19G1, связывающегося с человеческим (hu) FAP (А), мышинным (mu) FAP (Б), для клона 20G8, связывающегося с hu FAP (В), mu FAP (Г), и для клона 4B9, связывающегося с hu FAP (Д) и mu FAP (Е). Гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием модели взаимодействия 1:1;

на фиг. 2 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для Fab-фрагментов антитела к FAP с созревшей аффинностью. Представлены наборы обработанных кинетических данных для клона 5B8, связывающегося с hu FAP (А) и mu FAP (Б), для клона 5F1, связывающегося с hu FAP (В), mu FAP (Г), и для клона 14B3, связывающегося с hu FAP (Д) и mu FAP (Е). Гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием модели взаимодействия 1:1;

на фиг. 3 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для Fab-фрагментов антитела к FAP с созревшей аффинностью. Представлены наборы обработанных кинетических данных для клона 16F1, связывающегося с hu FAP (А) и mu FAP (Б), для клона 16F8, связывающегося с hu FAP (В), mu FAP (Г), и для клона ОЗС9, связывающегося с hu FAP (Д) и mu FAP (Е). Гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием интерактивной модели 1:1;

на фиг. 4 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для Fab-фрагментов антитела к FAP с созревшей аффинностью. Представлены наборы обработанных кинетических данных для клона О2D7, связывающегося с hu FAP (А) и mu FAP (Б), клона 28Н1, связывающегося с hu FAP (В), mu FAP (Г), обезьяны циномогус (яванский макак-крабод) супо FAP (Д), и для клона 22А3, связывающегося с hu FAP (Е), mu FAP (Ж) и супо FAP (З). Гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием модели взаимодействия 1:1;

на фиг. 5 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для Fab-фрагментов антитела к FAP с созревшей аффинностью. Представлены наборы обработанных кинетических данных для клона 29В11, связывающегося с hu FAP (А), mu FAP (Б), супо FAP (В), и для клона 23С10, связывающегося с hu FAP (Г), mu FAP (Д) и супо FAP (Е). Гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием модели взаимодействия 1:1;

на фиг. 6 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для антител 3F2 (А), 4G8 (Б) и 3D9 (В) к FAP в виде Fab-фрагментов, связывающихся с FAP человека, мышей и обезьян циномогус. Представлены наборы обработанных кинетических данных, гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием модели взаимодействия 1:1;

на фиг. 7 - результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для антител к FAP 3F2 (А), 4G8 (Б) и 3D9 (В), связывающихся в виде человеческого IgG с FAP человека, мышей и обезьян циномогус. Представлены наборы обработанных кинетических данных, гладкими линиями обозначены результаты глобальной аппроксимации полученных данных с использованием модели взаимодействия 1:1;

на фиг. 8 - репрезентативные изображения полученных из организма человека образцов (А) немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) после иммуногистохимического окрашивания для выявления FAP с помощью мышинового антитела 2F3 в виде IgG2a, (Б) аденокарциномы ободочной кишки после иммуногистохимического окрашивания для выявления FAP с помощью мышинового антитела 2F3 в виде IgG2a, (В) аденокарциномы ободочной кишки после иммуногистохимического окрашивания для выявления FAP с помощью мышинового антитела 3D9 в виде IgG2a, и Г) аденокарциномы ободочной кишки после иммуногистохимического окрашивания для выявления FAP с помощью мышинового антитела 4G8 в виде IgG2a. FAP был выявлен в строме опухоли во всех образцах и с помощью всех антител (левые панели), в то время как не было обнаружено окрашивания при использовании применяемого в качестве контроля изотипа антитела (правые панели);

на фиг. 9 - результаты анализа связывания человеческих антител к FAP в виде IgG1 с экспресси-

рующими FAP клетками HEK 293, стабильно трансфектированными человечески (А) или мышинным (Б) FAP, полученные с помощью FACS;

на фиг. 10 - результаты анализа связывания человеческих антител к FAP в виде IgG1 с DPPIV (CD26) или HER2, экспрессируемые стабильно трансфектированными клетками HEK 293, полученные с помощью FACS. Антитело к HER2 трастузумаб и антитело к CD26 применяли в качестве положительных контролей. Вторичное антитело, контроль IgG или вариант без антитела (только клетки) применяли в качестве отрицательных контролей;

на фиг. 11 - результаты анализа связывания человеческих антител к FAP в виде IgG1 с FAP на человеческих фибробластах (клеточная линия GM05389), полученные с помощью FACS. Вторичное антитело или вариант без антитела применяли в качестве отрицательных контролей;

на фиг. 12 - результаты анализа связывания человеческих антител к FAP в виде IgG1 с человеческими фибробластами (клеточная линия GM05389), различными человеческими опухолевыми линиями клеток или клетками HEK293, стабильно трансфектированными человеческим FAP, полученные с помощью FACS;

на фиг. 13(A) и (Б) - уровни экспрессии FAP на поверхности легочных фибробластов линии GM05389 в различные моменты времени после инкубации с человеческими антителами к FAP в виде IgG1 3F2 или 4G8, полученные с помощью FACS. Не обнаружено существенного снижения уровней экспрессии FAP, свидетельствующих о интернализации FAP. Представлены данные для вторичного антитела, используемого в качестве отрицательных контроля, при его индивидуальном применении;

на фиг. 14 - репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения окрашивания плазматической мембраны фибробластов легкого линии GM05389, полученные после связывания антитела к FAP 4G8 в виде IgG в течение 45 мин при 4°C (А), в течение 20 мин при 37°C (Б), в течение 1 ч при 37°C (В) или в течение 6 ч при 37°C (Г). Показано фоновое окрашивание, полученное при использовании в качестве контроля изотипа антитела к CD20 GA101. EEA1 является меткой ранних эндосом. Продemonстрировано персистентное окрашивание FAP на поверхности плазматической мембраны вплоть до 6 ч после связывания с антителом к FAP 4G8;

на фиг. 15 - результаты очистки и анализа человеческого IgG дикого типа 28H1.

А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 16 - результаты очистки и анализа созданного с помощью гликоинженерии человеческого IgG 28H1. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 17 - результаты очистки и анализа человеческого IgG дикого типа 29B11. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 18 - результаты очистки и анализа созданного с помощью гликоинженерии человеческого IgG 29B11. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 19 - результаты очистки и анализа человеческого IgG дикого типа 3F2. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 20 - результаты очистки и анализа созданного с помощью гликоинженерии человеческого IgG 3F2. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 21 - результаты очистки и анализа человеческого IgG дикого типа 4G8. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 22 - результаты очистки и анализа созданного с помощью гликоинженерии человеческого IgG 4G8. А) Стадия очистки аффинной хроматографией на белке А. Б) Стадия очистки геле-фильтрацией. В) Аналитический ДСН-ПААГ. Г) Аналитическая геле-фильтрация. Экспериментальная процедура описана в примере 1;

на фиг. 23 - результаты анализа связывания антитела к FAP с созревшей аффинностью 28H1 с человеческим FAP на клетках HEK293 в сравнении со связыванием родительского антитела к FAP 4G8;

на фиг. 24 - результаты анализа высвобождения LDH (лактатдегидрогеназа) для оценки ADCC, обусловленной антителами к FAP IgG-типа 28H1 (с созревшей аффинностью) и 4G8, 3F8 (родительское) в качестве версии дикого типа (wt) и версией антитела, созданной с помощью гликоинженерии (ge), с использованием HEK293-hFAP в качестве клеток-мишеней и PBMNC в качестве эффекторных клеток (генотип F/F FcγRIIIa).

I. Определения

"Человеческий акцепторный каркасный участок" в контексте настоящего описания обозначает каркасный участок, содержащий аминокислотную последовательность каркасного участка варибельной области легкой цепи (VL) или каркасного участка варибельной области тяжелой цепи (VH), выведенную из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, указанного ниже. Человеческий акцепторный каркасный участок "выведенный из" каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, может содержать такую же аминокислотную последовательность, что и указанные каркасные участки, или может нести замены в аминокислотной последовательности. Количество аминокислотных замен может составлять 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. Человеческий акцепторный каркасный участок VL идентичен по последовательности каркасного участка человеческого иммуноглобулина VL или последовательности человеческого консенсусного каркасного участка.

Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнера по связыванию (например, антигена). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, к антителу и антигену) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации (K_D), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Так, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая представленные в настоящем описании. Конкретные приведенные с целью иллюстрации примеры вариантов измерения аффинности связывания описаны ниже.

Понятие антитело "с созревшей аффинностью" относится к антителу с одним или несколькими изменениями (например, аминокислотными мутациями) в одном или нескольких из гиперварибельных участков (HVR) (например, CDR), по сравнению с родительским антителом, у которого отсутствуют указанные изменения, при этом указанные изменения приводят к повышению аффинности антитела к антигену. Как правило, антитело с созревшей аффинностью связывается с тем же эпитопом, что и родительское антитело.

Понятия "антитело к FAP" и "антитело, которое связывается с белком активации фибробластов (FAP)" относится к антителу, которое обладает способностью связываться с FAP с достаточной аффинностью, что позволяет применять антитело в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является FAP. Связывания антитела к FAP с неродственным, не представляющим собой FAP белком, составляет менее примерно 10% от степени связывания антитела с FAP, по данным, полученным, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА) или проточной цитометрии (FACS). Степень связывания описанного антитела к FAP с DPPIV, белком, близкородственным FAP (который обозначают также как CD26; GenBank, регистрационный номер P27487), составляет менее примерно 15%, примерно 10 или 5% от степени связывания антитела с FAP по данным FACS. Антитело, которое связывается с FAP, характеризуется величиной константы диссоциации (K_D), составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). Антитело к FAP может связываться с эпитопом FAP, консервативным для FAP из различных видов.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью. Оно относится также к фрагментам антител, включающим Fc-область, и слитым белкам, которые содержат область, эквивалентную Fc-области иммуноглобулина. Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv), димерные и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

Понятие "антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референс-антитело", относится к антителу, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном по данным анализа в конкурентном формате на 50% или более, и наоборот, референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном по данным анализа в конкурентном формате на 50% или более. Пример анализа конкуренции представлен в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающий центр" относится к части антигенсвязывающей молекулы, которая содержит область, специфически связывающуюся и являющуюся

комплементарной части антигена или полному антигену. Если антиген является крупным, то антигенсвязывающая молекула может связываться только с конкретной частью антигена, которую называют эпитопом. Антигенсвязывающий центр может представлять собой, например, один или несколько переменных доменов антитела (которые называют также переменными областями антитела). Предпочтительно антигенсвязывающий центр содержит переменную область легкой цепи (VL) антитела и переменную область тяжелой цепи антитела (VH).

Понятие "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или конкретных видов, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или других видов. Например, в химерных антителах несвязывающие антиген компоненты можно получать из антител широкого разнообразия видов, включая приматов, таких как шимпанзе, и людей. Гуманизированные антитела представляют собой наиболее предпочтительную форму химерных антител.

Понятие "класс" антител относится к типу константного домена или константной области тяжелых цепей антитела. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

В контексте настоящего описания понятие "цитотоксический агент" относится к субстанции, которая ингибирует или препятствует клеточной функции и/или вызывает гибель или деструкцию клетки. Цитотоксические агенты включают (но, не ограничиваясь только ими) радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические средства или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин C, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); ингибирующие рост средства; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные противоопухолевые или противораковые средства, указанные ниже.

В контексте настоящего описания понятие "эффекторная функция" относится к видам биологической активности, присущим Fc-области, которая варьирует в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются способность связываться с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активация В-клеток.

Понятие "эффективное количество" агента, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному при применении в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие относится к нативной последовательности Fc-областей и вариантам Fc-областей. Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG может простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может либо присутствовать, либо может не присутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, называемой также EU-индексом, которая описана у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

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

"Каркасные участки" или "FR"-участки представляют собой участки переменных областей, отличные от остатков гиперпеременных участков (HVR) (или CDR). FR переменной области, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-

FR3-H3(L3)-FR4.

В контексте настоящего описания понятия "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "полное антитело" используют взаимозаменяемо, и они относятся к антителу, имеющему строение, практически сходное со строением нативного антитела, или имеющему тяжелые цепи, которые содержат указанную в настоящем описании Fc-область.

В контексте настоящего описания понятия "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. Так, понятия "трансформанты" и "трансформированные клетки" клетки-хозяева включают первичные рассматриваемые клетки, а также культуры, выведенные из них, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации.

Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекций исходная трансформированная клетка. Клетку-хозяина можно сконструировать так, чтобы с ее помощью получать антитело с модифицированными олигосахаридами. Для этого клетки-хозяева подвергали дополнительным манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII). Клетки-хозяева представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) культивируемые клетки, например культивируемые клетки млекопитающих, такие как CHO-клетки, ВНК-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышинной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и растительные клетки, а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, которое несет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или в человеческой клетке, или полученное из источника кроме человека, в котором продуцируются популяции человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Из указанного понятия человеческого антитела специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

"Человеческий консенсусный каркасный участок" представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют из подгруппы последовательностей переменных доменов. Подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., NIH Publication 91-3242, Bethesda MD, т.т. 1-3, 1991. Касательно VL подгруппа может представлять собой подгруппу каппа I согласно Kabat и др., выше, а касательно VH подгруппа может представлять собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

Понятие "гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. Гуманизированное антитело должно содержать практически все по меньшей мере из одного и, как правило, двух переменных доменов, в котором(ых) все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все из FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из человеческого антитела. Понятие "гуманизированная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергнуто гуманизации.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков переменного домена антитела, последовательность которых являются гипервариабельной, и/или которые образуют структуры в виде петель ("гипервариабельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из "определяющих комплементарность участков" (CDR), последние отличаются наиболее выраженной вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Кроме CDR1 в VH CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые образуют гипервариабельные петли. Понятие "гипервариабельные участки" (HVR) относится также к "определяющим комплементарность участкам" (CDR), и эти понятия используют взаимозаменяемо касательно положений вариабельной области, которые формируют антигенсвязывающие центры. Эта конкретная область описана у Kabat и др., U.S. Dept. of Health and Human Services, *"Sequences of Proteins of Immunological Interest"*, 1983 и у Chothia и др., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917, причем эти определения относятся к перекрывающимся аминокислотным остаткам или поднаборам аминокислотных остатков при их сравнении друг с другом. Однако в контексте настоящего описания подразумевается возможность применения любого определения CDR антитела или его вариантов. Соответствующие аминокислотные остатки, из которых состоят CDR, как они определены в каждой из процитированных выше ссылок, представлены в сравнении ниже в табл. 1. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, должны варьироваться в зависимости от

последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области на основе данных об аминокислотной последовательности варибельной области антитела легко могут определить, какие остатки входят в конкретный CDR.

Таблица 1. Определения CDR

	Кэбот	Хотиа	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-32
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

Нумерация всех входящих в CDR остатков в табл. 1 дана в соответствии с номенклатурой, предложенной Кэботом с соавторами (см. ниже).

Обозначение "AbM" с прописной буквой "b", использованное в табл. 1, относится к CDR, как они определены программой для моделирования антител "AbM" компании Oxford Molecular Group.

Кэбот с соавторами предложили также систему нумерации (номенклатуру) последовательностей варибельных областей, которую можно применять для любого антитела. Обычный специалист в данной области может однозначно применять эту систему "нумерации по Кэботу" к любой последовательности варибельной области, не имея никаких экспериментальных данных, кроме сведений о самой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нумерация по Кэботу" относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", изд-во U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983. Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в варибельной области антитела даны в соответствии с системой нумерации по Кэботу.

CDR содержат также "определяющие специфичность остатки" или "SDR", которые представляют собой остатки, контактирующие с антигеном. SDR входят в области CDR, обозначенные как укороченные CDR или a-CDR. В целом, только от 1/5 до 1/3 остатков в данном CDR принимают участие в связывании антигена. Определяющие специфичность остатки в конкретном CDR можно идентифицировать, например, путем компьютерной обработки межатомных контактов при трехмерном моделировании и определения варибельности последовательности в данном положении остатка с использованием методов, описанных у Padlan и др., FASEB J. 9(1), 1995, сс. 133-139. Приведенные в качестве примера a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 и a-CDR-H3) находятся на аминокислотных остатках 31-34 в L1, 50-55 в L2, 89-96 в L3, 31-35B в H1, 50-58 в H2 и 95-102 в H3 (см. Almagro и Fransson, Front. Biosci 13, 2008, сс. 1619-1633).

"Конъюгат антитела" представляет собой антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающее представляет собой (но, не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы кроме человека, такие как мартышки), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы).

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонентов его естественного окружения и может быть очищено до уровня чистоты, превышающего 95 или 99% по данным, полученным, например, с помощью электрофоретических методов (например, ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических методов (например, ионообменная ЖХВР или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов, предназначенных для оценки чистоты антител, см., например, у Flatman и др., J. Chromatogr. B 848, 2007, сс. 79-87.

"Выделенный" полинуклеотид означает молекулу полинуклеотида, которая отделена от компонентов ее естественного окружения. Выделенный полинуклеотид представляет собой молекулу полинуклеотида, находящуюся в клетке, которая, как правило, содержит молекулу полинуклеотида, но при этом молекула полинуклеотида присутствует вне хромосомы или локализована в хромосоме в локусе, отличном от локуса ее локализации в хромосоме в естественных условиях.

Понятие "выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело к FAP" относится к одной или нескольким полинуклеотидным молекулам, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или его фрагменты), включая указанную(ые) полинуклеотидную(ые) молекулу(ы), которая(ые) находится(ятся) в одном векторе или в разных векторах, и указанная(ые) полинуклеотидная(ые) молекула(ы) присутствует в одной или нескольких областях в клетке-хозяине.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих встречающиеся в естественных условиях мутации или возникающих в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как

правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, прилагательное "моноклональный" определяет особенность антитела, характеризуя его как полученное из практически гомогенной популяции антител, а не сконструированное в соответствии с требованиями к получению антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела можно создавать с помощью различных технологий, включая (но, не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы на основе трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов иммуноглобулина, указанные методы и другие, приведенные в качестве примера методы получения моноклональных антител, представлены в настоящем описании.

Понятие "оголенное антитело" относится к антителу, не конъюгированному с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксичным фрагментом) или радиоактивной меткой. Оголенное антитело может присутствовать в фармацевтической композиции.

Понятие "нативные антитела" относятся к встречающимся в естественных условиях молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные антитела в виде IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь в направлении от N- к C-концу содержит вариабельную область (VH), которую называют также вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой расположены три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому каждая легкая цепь в направлении от N- к C-концу содержит вариабельную область (VL), которую называют также вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которой расположен константный легкий (CL) домен, который называют также константной областью легкой цепи. Легкая цепь может относиться к одному из двух типов, обозначенных как каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена.

Понятие "не обладает значительной перекрестной реактивностью" означает, что молекула (например, антитело) не распознает или не связывается специфически с антигеном, отличным от фактического антигена-мишени молекулы (например, антигеном, близкородственным антигену-мишени), прежде всего по сравнению с антигеном-мишенью. Например, уровень связывания антитела с антигеном, отличным от фактического антигена-мишени, может составлять от менее чем примерно 10% до менее чем примерно 5%, или уровень связывания с указанным антигеном, отличным от фактического антигена-мишени, может составлять менее чем примерно 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,2 или 0,1%, предпочтительно менее чем примерно 2, 1 или 0,5% и наиболее предпочтительно уровень связывания с антигеном, отличным от фактического антигена-мишени, может составлять менее чем примерно 0,2 или 0,1%.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковке" относится к инструкциям, которые обычно находятся в поступающих в продажу упаковках терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

Понятие "родительское" антитело относится к антителу, применяемому в качестве исходного или основы для получения варианта.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступных компьютерных программ, таких как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величину % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранение вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Программа ALIGN-2 представляет собой публично доступную программу фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. В программе

ALIGN-2 все параметры для сравнения последовательностей являются заданными и не должны изменяться.

В ситуации, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б (которую другими словами можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или отличается определенным % идентичности аминокислотной последовательности относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{частное } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и Б с помощью указанной программы, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности Б не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящего описания все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

Аналогично этому под нуклеотидной кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% "идентична" нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевают, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, при получении полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, которые встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо в одну или несколько из смежных групп в референс-последовательности. На практике решение вопроса о том, идентичен ли конкретный полинуклеотид или полипептид по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например, указанных выше.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Понятие "белок активации фибробластов (FAP)" в контексте настоящего описания относится к любому нативному FAP из любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человеческий, см. GenBank, регистрационный номер AAC51668) и грызуны (например, мышинный, см. GenBank, регистрационный номер AAN19190), если специально не указано иное. Понятие относится к "полноразмерному" непротессированному FAP, а также к любой форме FAP, образовавшейся в результате процессинга в клетке. Понятие относится также к встречающимся в естественных условиях вариантам FAP, например, сплайсинговым вариантам или аллельным вариантам. Предпочтительно антитело к FAP связывается с внеклеточным доменом FAP. Приведенные в качестве примера аминокислотные последовательности эктодоменов человеческого, мышинного FAP и FAP обезьяны циномоглус (с С-концевым полилизинном и 6×His-меткой) представлены в SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 319 и SEQ ID NO: 321 соответственно.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, пре-

дупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезни и ремиссия или улучшение прогноза.

Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, которая участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит 4 консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628).

В контексте настоящего описания понятие "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью амплифицировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Понятие относится к вектору как самореплицирующейся содержащей нуклеиновую кислоту структуре, а также к вектору, встроенному в геном клетки-хозяина, в которую интродуцирован вектор. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в контексте настоящего описания обозначают как "экспрессионные векторы".

В контексте настоящего описания понятие "полипептид, обладающий активностью GnTIII" относится к полипептидам, которые могут катализировать добавление остатка N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в β -1-4-связи к β -связанному маннозиду триманнозильного ядра N-связанных олигосахаридов. Этот процесс включает слияние полипептидов, обладающих ферментативной активностью, сходной, но не обязательно идентичной с активностью β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, известной также как β -1,4-маннозилгликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза (КФ 2.4.1.144) согласно номенклатуре Комитета по номенклатуре Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB)), при оценке с помощью конкретного биологического анализа как в случае зависимости от дозы, так и без зависимости от дозы. В случае, когда существует зависимость от дозы, фермент не должен быть обязательно идентичен GnTIII, а скорее он должен быть практически подобен ей в отношении зависимости данной активности от дозы по сравнению с GnTIII (т.е. полипептид-"кандидат" должен обладать более высокой активностью или не более чем примерно в 25 раз пониженной активностью, предпочтительно не более чем примерно в 10 раз пониженной активностью, и еще более предпочтительно не более чем примерно в 3 раза пониженной активностью по сравнению с GnTIII).

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

В контексте настоящего описания понятие "инженерия" (создание), "созданный с помощью инженерии", "процесс создания с помощью инженерии", прежде всего с приставкой "глико", а также понятие "инженерия гликозилирования" (гликоинженерия, конструирование схемы гликозилирования), относятся к любой манипуляции, которой подвергают схему гликозилирования встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Конструирование схемы гликозилирования включает метаболическое конструирование механизма гликозилирования клетки, в том числе генетические манипуляции, касающиеся путей олигосахаридного синтеза, с целью получения измененного гликозилирования гликопротеинов, экспрессируемых в клетках. Кроме того, инженерия гликозилирования включает воздействия мутаций и клеточного окружения на гликозилирование. Инженерию гликозилирования можно осуществлять с целью изменения гликозилтрансферазной активности. Она также позволяет изменять активность глюкозаминилтрансферазы и/или активность фукозилтрансферазы.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность" относится к антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC) и клеточнозависимой цитотоксичности, опосредованной растворимым слитым с Fc белком, который содержит человеческую Fc-область. Это представляет собой механизм иммунитета, приводящий к лизису "меченных (антителом) клеток" "человеческими иммунокомпетентными эффекторными клетками".

Понятие "человеческие иммунокомпетентные эффекторные клетки" означает популяцию лейкоцитов, несущих на поверхности Fc-рецепторы, с помощью которых они связываются с Fc-областью антител или со слитыми с Fc белками и осуществляют эффекторные функции. Такая популяция может включать (но, не ограничиваясь ими) периферические мононуклеарные клетки (PBMC) и/или естественные клетки-киллеры (NK).

В контексте настоящего описания понятие "меченные (антителом) клетки" относится к клеткам, с которыми специфически связываются антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-область (например, антитела или их фрагменты, которые содержат Fc-область), или слитые с Fc белки. Антигенсвязы-

вающие молекулы или слитые с Fc белки связываются с клетками-мишенями посредством N-концевого по отношению к Fc-области белкового фрагмента.

В контексте настоящего описания понятие "повышенная Fc-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность" относится к любому увеличению количества "меченных (антителом) клеток", подвергнутых лизису в данный момент времени при данной концентрации антитела или слитого с Fc белка, в среде, окружающей клетки-мишени, с помощью указанного выше механизма Fc-опосредованной клеточнозависимой цитотоксичности и/или снижению концентрации антитела или слитого с Fc белка в среде, окружающей клетки-мишени, необходимой для лизиса данного количества "меченных (антителом) клеток" в данный момент времени с помощью механизма Fc-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности. Повышение уровня Fc-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности оценивают относительно клеточнозависимой цитотоксичности, опосредованной той же антигенсвязывающей молекулой или тем же слитым с Fc белком, которая/который продуцируется в таком же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения (которые известны специалистам в данной области), но которая/который не продуцировалась/продуцировался клеткой-хозяином, сконструированной так, чтобы она имела измененную схему гликозилирования (например, так, чтобы в ней происходила экспрессия гликозилтрансферазы GnTIII или других гликозилтрансфераз), с помощью методов, представленных в настоящем описании.

Под "антителом, обладающим повышенной антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC)" подразумевается антитело, как оно определено выше, обладающее ADCC при определении с помощью любого приемлемого метода, известного обычным специалистам в данной области. Один из приемлемых методов анализа *in vitro* ADCC заключается в том, что:

- 1) для анализа применяют клетки-мишени, для которых известно, что они экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антигенсвязывающим центром антитела;
- 2) для анализа в качестве эффекторных клеток используют человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), выделенные из крови произвольно выбранных здоровых доноров;
- 3) анализ осуществляют с помощью следующего протокола:

I) PBMC выделяют с помощью стандартных методов центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют 5×10^6 клеток/мл в RPMI-среде для культуры клеток;

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

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

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

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

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

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

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

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

X) рассчитывают процент специфического лизиса для каждой концентрации антитела согласно формуле $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, где ER обозначает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для указанной концентрации антитела, MR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для MR-контролей (см. п. V, выше), а SR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для SR-контролей (см. п. VI, выше);

4) "повышенную ADCC" определяют либо как увеличение максимального процента специфического лизиса, обнаруженного при использовании указанного выше диапазона концентраций антитела, и/или как снижение концентрации антитела, необходимой для достижения половины от максимального процента специфического лизиса, обнаруженного при использовании указанного выше диапазона концен-

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

II. Композиции и методы

Белок активации фибробластов (FAP) экспрессируется в большинстве опухолей, но практически отсутствует в здоровых тканях взрослых индивидуумов, поэтому антитела, мишенью которых является этот антиген, имеют большой терапевтический потенциал. В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с FAP, в частности антитела, обладающие высокой аффинностью и сильными эффекторными функциями. Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять, например, для диагностирования или лечения заболеваний, отличающихся экспрессией FAP, таких как рак.

A. Примеры антител к FAP

В настоящем изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с белком активации фибробластов (FAP). В частности, в настоящем изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с FAP, где антитела создают с помощью гликоинженерии так, чтобы они обладали повышенной эффекторной функцией.

1. Аффинность антител

В антитело, представленное в настоящем описании, имеет величину константы диссоциации (K_D) составляющую ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). Предпочтительно связывание антител, представленных в настоящем описании, с белком активации фибробластов (FAP), в частности с человеческим FAP, характеризуется величиной K_D , составляющей менее 1 нМ, при определении методом резонанса поверхностного плазмона (SPR).

K_D измеряют, в частности, используя метод резонанса поверхностного плазмона. Указанный анализ можно осуществлять, например, с помощью устройства BIACORE®-T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C, используя CM5-чипы для иммобилизации антигена. В целом, метод состоит в следующем: биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, фирма GE Healthcare) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антитело к His (Penta His, фирма Qiagen) разводят в 10 мМ ацетате натрия, pH 5 до концентрации 40 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин до достижения примерно 9000 единиц ответа (RU) считанного белка. После инъекции антитела к His инъецируют 1М этаноламин для того, чтобы блокировать непрореагировавшие группы. Затем меченный His антиген инъецируют со скоростью 10 мкл/мин в концентрации 10 нМ в течение 20 с (для оценки Fab-фрагментов) или в концентрации 20 нМ в течение 25 с (для оценки антител типа IgG) и "захватывают" через его His-метку с помощью иммобилизованного антитела к His. Белковые и ДНК последовательности приемлемых конструкций антигена FAP представлены в SEQ ID NO: 317-322. Для кинетических измерений серийные разведения антитела (двукратные разведения в диапазоне от 6,25 до 200 нМ для Fab-фрагментов или пятикратные разведения в диапазоне от 3,2 пМ до 10 нМ для IgG) в 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4 инъецируют при 25°C со скоростью потока 90 мкл/мин. Используют следующие параметры: продолжительность реакции ассоциации 180 с, продолжительность реакции диссоциации 300 с (для Fab) или 900 с (для IgG), регенерация с помощью 10 мМ глицина, pH 2 в течение 60 с между каждым циклом. Константы скорости реакции ассоциации (k_{on}) и константы скорости реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывают с помощью простой модели связывания 1:1 Ленгмюра (программа для оценки BIACORE® T100) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (K_D) рассчитывают в виде отношения k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881).

2. Фрагменты антител

Фрагменты антитела представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) Fab-, Fab'-, Fab'-SH-, F(ab')₂-, Fv- и scFv-фрагменты и другие фрагменты, описанные ниже. Обзор конкретных фрагментов антител см. у Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134 или Carter, Nat. Rev. Immunol. 6, 2006, сс. 343-357.

Одноцепочечные Fv- или scFv-фрагменты содержат VH-домен и VL-домен в виде одноцепочечной полипептидной цепи. Как правило, VH- и VL-домены сцеплены линкерной последовательностью. Обзор scFv-фрагментов см, например, у Pluckthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, под ред. Rosenburg и Moore (изд-во Springer-Verlag, New York), т. 113, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185 и US №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab- и F(ab')₂-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором "спасения", и обладающих удлиненным временем полужизни in vivo, см. в US № 5869046.

Димерные антитела (диабоды) представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими центрами, которые могут быть двухвалентными или юниспецифическими (см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134 и Hollinger и др., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448). Тримерные антитело (триабоди) и тетрамерные антитела (тетрабоди) описаны также у Hudson и др. Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134.

"Мини-тело" представляет собой двухвалентное гомодимерное производное scFv, которое содержит константную область, как правило, CH3-домен иммуноглобулина, предпочтительно IgG-типа, более предпочтительно IgG1, в качестве области димеризации. Как правило, константная область сцелена с scFv через шарнирную область и/или линкерную область. Примеры белков мини-тел представлены у Ну и др., Cancer Res. 56, 1996, сс. 3055-3061.

Одноцепочечные антитела представляют собой фрагменты антител, которые содержат весь или часть варибельного домена тяжелой цепи или весь или часть варибельного домена легкой цепи антитела (фирма Domantis, Inc., Валтам, шт. Массачусетс см., например, US № 6248516 B1).

Фрагменты антител можно получать различными методами, включая (но, не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с использованием рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как указано в настоящем описании.

3. Химерные и гуманизированные антитела

Некоторые химерные антитела описаны, например, в US № 4816567 и у Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, сс. 6851-6855. Например, химерное антитело содержит нечеловеческую варибельную область (например, варибельную область из антитела мышей, крыс, хомяков, кроликов или приматов кроме человека, таких как обезьяны) и человеческую константную область. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело "переключенного класса", класс или подкласс которого изменен по сравнению с родительским антителом. К химерным антителам относятся также их антиген-связывающие фрагменты.

Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для уменьшения иммуногенности для людей с сохранением специфичности и аффинности родительского нечеловеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или несколько варибельных доменов, в котором(ых) HVR, например, CDR (или их фрагменты) выводят из нечеловеческого антитела, а FR (или их фрагменты) выводят из последовательностей человеческих антител. Гуманизированное антитело необязательно может содержать также по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменяют на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого выведены остатки HVR), например, для сохранения или повышения специфичности или аффинности антитела. Для гуманизации можно применять различные методы, включая (но, не ограничиваясь только ими) (а) трансплантацию полных нечеловеческих варибельных доменов в человеческие константные области с получением химерных антител, (б) трансплантацию только нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитела-реципиента) каркасный участок и константные области с сохранением или без сохранения имеющих решающее значение остатков каркасного участка (например, остатков, важных для сохранения высокой аффинности связывания антигена или функций антитела), (в) трансплантацию только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатков, имеющих решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческие каркасные или константные области, или (г) трансплантацию полных нечеловеческих варибельных доменов, но «маскируя» их сегментом, напоминающим человеческий, путем замены поверхностных остатков. Гуманизированные антитела и методы их получения обобщены, например, у Almagro и Fransson, Front. Biosci. 13, 2008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., Nature 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033; US №№. 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., Nature 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, Adv. Immunol. 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeyen и др., Science 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, Molec. Immun. 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri и др., Methods 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28, 1991, сс. 489-498 (описание "нанесения нового покрытия"); Dall'Acqua и др., Methods 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR") и Osbourn и др., Methods 36, 2005, сс. 61-68 и у Klimka и др., Br. J. Cancer 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе "целенаправленной селекции" для перестановки FR).

Человеческие каркасные участки, которые можно применять для гуманизации, включают (но, не ограничиваясь только ими): каркасные участки, выбранные на основе метода "наилучшего подбора" (см., например, Sims и др., J. Immunol. 151, 1993, с. 2296); каркасные участки, выведенные из консенсусной последовательности человеческих антител конкретной подгруппы варибельных областей легких или тяжелых цепей (см., например, Carter и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1992, с. 4285 и Presta и др., J. Immunol., 151, 1993, с. 2623); человеческие зрелые (подвергнутые соматической мутации) каркасные участки или каркасные участки человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro и Fransson, Front. Biosci. 13, 2008, сс. 1619-1633); и каркасные участки, полученные в результате скрининга FR-библиотек (см., например, Vasa и др., J. Biol. Chem. 272, 1997, сс. 10678-10684) и Rosok и др., J. Biol. Chem. 271, 1996, сс. 22611-22618).

4. Человеческие антитела

Человеческие антитела можно получать различными методами, известными в данной области. Че-

ловеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 2001, сс. 368-74 и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20, 2008, сс. 450-459.

Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что продуцирует интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими вариабельными областями в ответ на контрольное заражение антигеном. Указанные животные, как правило, содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, которыми заменены эндогенные локусы иммуноглобулина, или которые присутствуют вне хромосом или интегрированы произвольно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулина, как правило, инактивированы. Обзор методов получения человеческих антител в трансгенных животных см. у Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, сс. 1117-1125. Они описаны также, например, в US №№ 6075181 и 6150584 в которых описана технология XENOMOUSE™; US № 5770429, в котором описана технология HUMAB®; US 7041870, в котором описана технология K-M MOUSE® и в публикации заявки на патент США № 2007/0061900, в котором описана технология VELOCIMOUSE®. Человеческие вариабельные области интактных антител, полученные в таких животных, можно дополнительно модифицировать, например, объединяя с человеческой константной областью из другого антитела.

Человеческие антитела можно получать также с помощью методов, основанных на применении гибридом. Описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы, предназначенные для получения человеческих моноклональных антител (см., например, Kozbor, *J. Immunol.*, 133, 1984, с. 3001; Brodeur и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 1987, сс. 51-63 (изд-во Marcel Dekker, Inc., New York); и Boerner и др., *J. Immunol.*, 147, 1991, с. 86). Человеческие антитела, созданные с помощью технологии, основанной на применении человеческих В-клеточных гибридом, описаны также у Li и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2006, сс. 3557-3562. Дополнительные методы представляют методы, описанные, например, в US № 7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител типа IgM из клеточных линий гибридом) и у Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4), 2006, сс. 265-268 (описание человеческих-человеческих гибридом). Технология, основанная на применении человеческих гибридом (Trioma-технология), описана также у Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3), 2005, сс. 927-937 и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3), 2005, сс. 185-191.

Человеческие антитела можно создавать также путем выделения последовательностей вариабельных доменов Fv-клона, выбранных из фаговых дисплейных библиотек, для создания которых использовали человеческие антитела. Указанные последовательности вариабельных доменов затем можно объединять с требуемым человеческим константным доменом. Методики отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

5. Полученные из библиотек антитела

Антитела можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны разнообразные методы для создания фаговых дисплейных библиотек и скрининга указанных библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Указанные методы обобщены, например, у Hoogenboom и др., в *Methods in Molecular Biology*, под ред. O'Brien и др., изд-во, Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37 и описаны также, например, у McCafferty и др., *Nature* 348, сс. 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628; Marks и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1992, сс. 581-597; Marks и Bradbury, в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo и др., изд-во, Human Press, Totowa, NJ, 248, 2003, сс. 161-175; Sidhu и др., *J. Mol. Biol.* 338(2), 2004, сс. 299-310; Lee и др., *J. Mol. Biol.* 340(5), 2004, сс. 1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34), 2004, сс. 12467-12472; и Lee и др., *J. Immunol. Methods* 284(1-2), 2004, сс. 119-132.

При осуществлении некоторых методов фагового дисплея популяции VH- и VL-генов клонируют по отдельности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговых библиотеках, которые затем подвергают скринингу в отношении антигенсвязывающего фага согласно методу, описанному у Winter и др., *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 1994, сс. 433-455. Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, включают антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, при этом отсутствует необходимость в создании гибридом. В альтернативном варианте можно клонировать необработанную ("наивную") популяцию (например, из организма человека), получая один источник антител к широкому спектру чужих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, что описано у Griffiths и др., *EMBO J.*, 12, 1993, сс. 725-734. И, наконец, необработанные ("наивные") библиотеки можно получать также методами синтеза путем клонирования неперегруппированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с помощью ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных CDR3-участков и для осуществления перегруппировки *in vitro* согласно методу, описанному у Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 227, 1992, сс. 381-388.

Фаговые библиотеки человеческих антител описаны, например, в следующих патентных публикациях: US № 5750373 и публикации заявок на патент США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, рассматриваются как человеческие антитела или фрагменты человеческих антител.

6. Мультиспецифические антитела

Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают способностью специфически связываться по меньшей мере с двумя различными сайтами. Одна из связывающихся специфичностей связывается с FAP, а другая с любым другим антигеном. Биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами FAP. Биспецифические антитела можно использовать также для локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих FAP. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или в виде фрагментов антител.

Методы создания мультиспецифических антител включают (но, не ограничиваясь только ими) рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелой цепь-легкая цепь иммуноглобулина, которые обладают различными специфичностями (см. Milstein и Cuello, Nature 305, 1983, с. 537, WO 93/08829 и Traunecker и др., EMBO J. 10, 1991, с. 3655), и конструирование на основе технологии "knob-in-hole" (взаимодействие по типу выступ-впадина) (см., например, US № 5731168). Мультиспецифические антитела можно получать также путем создания обусловленных электростатическим действием эффектов для создания молекул антител с гетеродимерной Fc-областью (WO 2009/089004A1); путем поперечного сшивания двух или большего количества антител или их фрагментов (см., US № 4676980 и Brennan и др., Science 229, 1985, с. 81); с использованием "лейциновых молний" для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny и др., J. Immunol. 148(5), 1992, сс. 1547-1553); с использованием технологии "диабоды" (димерных антител) для создания фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, сс. 6444-6448); и с использованием димеров одноцепочечных Fv (scFv) (см., например, Gruber и др., J. Immunol., 152, 1994, с. 5368); путем получения триспецифических антител согласно методу, описанному, например, у Tutt и др., J. Immunol. 147, 1991, с. 60.

Антитела с тремя или большим количеством антигенсвязывающих центров включают "антитела-осьминоги" (см., например, US 2006/0025576A1).

Антитело или его фрагмент может включать также "Fab двойного действия" или "DAF", которые содержат антигенсвязывающий центр, который связывается с FAP, а также с другим, отличным от него антигеном (см. например, US 2008/0069820).

7. Варианты антител

Конкретными вариантами осуществления изобретения являются варианты аминокислотных последовательностей антител. Например, может требоваться повышение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антител можно получать путем интродукции соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Указанные модификации включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно использовать любую комбинацию делеций, инсерций и замен, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, способностью связывать антиген.

а) Полученные путем замены, инсерции и делеции варианты

Представляющими интерес сайтами для замещающего мутагенеза являются HVR и FR.

Аминокислотные замены могут приводить к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую сходные структурные и/или химические свойства, например, консервативные аминокислотные замены. «Консервативные» аминокислотные замены можно создавать на основе сходства в полярности, заряде, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы используемых для этой цели остатков. Например, к неполярным (гидрофобным) аминокислотам относятся аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; к полярным нейтральным аминокислотам относятся глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; к положительно заряженным (основным) аминокислотам относятся аргинин, лизин и гистидин; и к отрицательно заряженным (кислотным) аминокислотам относятся аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. Консервативные замены представлены в табл. 2 под заголовком "предпочтительные замены". Более важные замены представлены в табл. 2 под заголовком "приведенные в качестве примера замены", и как дополнительно описано ниже, со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно интродуцировать в представляющее интерес антитело и продукты подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например, сохранения/повышения способности к связыванию антигена, пониженной иммуногенности или улучшенной ADCC или CDC.

Таблица 2

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Под неконсервативными заменами подразумевают замену представителя одного из указанных классов на представителя из другого класса. Например, аминокислотные замены могут приводить также к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую другие структурные и/или химические свойства, например, замена аминокислоты из одной группы (например, полярной) на другую аминокислоту из другой группы (например, основной). Приемлемость вариации можно определять экспериментально путем системного осуществления инсерций, делеций или замен аминокислот в полипептидной молекуле с помощью методов рекомбинантной ДНК и оценки активности полученных в результате рекомбинантных вариантов.

Один тип полученного в результате замены варианта включает замену одного или нескольких остатков в гипервариабельном участке родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, образовавшийся(еся) вариант(ы), выбранный(ые) для дальнейшего изучения, должен(ны) иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенная аффинность, пониженная иммуногенность) относительно родительского антитела и/или должен(ны) практически сохранять определенные биологические свойства родительского антитела. Примером полученного в результате замены варианта является антитело с созревшей аффинностью, которое можно легко получать, например, помощью методов созревания аффинности на основе фагового дисплея, которые указаны в настоящем описании. В целом, метод состоит в следующем: один или несколько остатков HVR подвергают мутации и представляющие собой варианты антитела экспонируют на фаге и подвергают скринингу в отношении конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замены) можно осуществлять в HVR, например, для повышения аффинности антитела. Указанные изменения можно делать в "горячих точках" в HVR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвергаются мутации в процессе соматического мутагенеза (см., например, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207, 2008, сс. 179-196), и/или SDR (a-CDR), осуществляя оценку полученного варианта VH или VL в отношении аффинности связывания. Созревание аффинности путем создания и повторной селекций вторичных библиотек описано, например, у Hoogenboom и др., в: Methods in Molecular Biology, под ред. O'Brien и др., изд-во, Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37). Согласно некоторым вариантам созревания аффинности вносят разнообразие в гены вариабельных областей, выбранные для созревания, с помощью любого из многочисленных методов (таких, например, как ПЦР пониженной точности, перестановка цепи или сайтнаправленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов). Затем создают вторичную библиотеку. Затем библиотеку подвергают скринингу для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой метод внесения разнообразия включает подходы, связанные с HVR, при осуществлении которых рандомизируют несколько остатков в HVR (например, 4-6 остатков одновременно). Конкретные остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно идентифицировать, например, с помощью мутагенеза на основе сканирования алалином или посредством моделирования. В частности, мишенями часто являются CDR-H3 и CDR-L3.

Замены, инсерции или делеции могут иметь место в одном или нескольких HVR, если указанные

изменения не существенно снижают способность антитела связываться с антигеном. Например, в HVR можно осуществлять консервативные изменения (например, указанные в настоящем описании консервативные замены), которые не приводят к существенному снижению аффинности связывания. Указанные изменения могут находиться вне "горячих (активных) точек" HVR или SDR. Варианты последовательностей VH и VL каждый HVR могут быть неизмененным, либо содержат не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Ценным методом для идентификации остатков или участков антитела, которые можно подвергать мутагенезу, является метод, получивший название "аланин-сканирующий мутагенез", он описан у Cunningham и Wells, Science, 244, 1989, сс. 1081-1085. При осуществлении этого метода идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для определения того, оказывает ли такая замена влияние на взаимодействие антитела с антигеном. В аминокислотные положения, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к начальным заменам, можно интродуцировать дополнительные замены. В альтернативном или дополнительном варианте может оказаться ценным анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Указанные участвующие в контакте остатки и соседние остатки можно рассматривать в качестве мишеней или исключать из рассмотрения в качестве кандидатов для замены. Варианты можно подвергать скринингу для определения, обладают ли они требуемыми свойствами.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают amino- и/или карбоксиконцевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащие сто или большее количество остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примером результата осуществления терминальных инсерций является антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (как, например, в случае ADEPT (антитело-направленный фермент пролекарственной терапии) или с полипептидом, который удлинит время полужизни антитела в сыворотке.

б) Варианты гликозилирования

Можно также осуществлять модификации олигосахарида в антителе, для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

Гликоформы антител к FAP могут обладать повышенной эффекторной функцией, включая антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность. Инженерия гликозилирования антител описана ранее (см., например, US № 6602684, полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Методы получения антител к FAP с использованием клеток-хозяев, которые имеют измененную активность генов, участвующих в гликозилировании, также подробно представлены в настоящем описании (см. раздел, озаглавленный "Методы рекомбинации и композиции", ниже).

Молекула IgG несет два N-связанных олигосахарида в Fc-области, по одному на каждой тяжелой цепи. Как любой гликопротеин, антитело продуцируется в виде популяции гликоформ, которые имеют одинаковый полипептидный каркас, но различные олигосахариды, присоединенные к сайтам гликозилирования. Олигосахариды, присутствующие в норме в Fc-области сывороточного IgG, относятся к сложному биантенному типу (Wormald и др., Biochemistry 36, 1997, сс. 130-138) с низким содержанием концевой сиаловой кислоты и двурасекающего N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и с различными уровнями концевой галктозилирования и корового фукозилирования (фукозы, присоединенной к остатку GlcNAc в «стебле» биантенной олигосахаридной структуры). В некоторых исследованиях было высказано предположение, что для связывания с FcγR внутри олигосахаридного ядра требуется минимальная углеводная структура (Lund и др., J. Immunol. 157, 1996, сс. 4963-4969).

В мышинных или хомячковых клеточных линиях, которые применяют в промышленности и научных исследованиях для получения антител, как правило, происходит присоединение требуемых олигосахаридных детерминант к Fc-сайтам. Однако IgG, экспрессируемые этими клеточными линиями, не содержат двурасекающего GlcNAc, обнаруженного в небольших количествах в сывороточных IgG (Lifely и др., Glycobiology 318, 1995, сс. 813-822). В пути N-связанного гликозилирования двурасекающий GlcNAc добавляется с помощью GnTIII (Schachter, Biochem. Cell Biol. 64, 1986, сс. 163-168).

Umana с соавторами использовали одну антитело продуцирующую линию CHO-клеток, которая ранее была создана для экспрессии под воздействием внешней регуляции различных уровней клонированного гена фермента GnTIII (Umana P. и др., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180). Этот подход использовали прежде всего для доказательства строгой корреляции между экспрессией гликозилтрансферазы (например, GnTIII) и ADCC-активностью модифицированного антитела. Можно получить антителам к FAP, содержащие Fc-область или область, эквивалентную Fc-области, с измененным гликозилированием в результате изменения уровня экспрессии гена гликозилтрансферазы в антителопродуцирующей клетке-хозяине. Изменение уровня генной экспрессии представляет собой повышение GnTIII-активности. Повышенная GnTIII-активность приводит к повышению процентного содержания бисекционных олигосахаридов, а также к снижению процентного содержания фукозизлированных олигосахаридов в Fc-области антитела. Это антитело или его фрагмент обладает повышенной аффинностью связывания с Fc-

рецептором и повышенной эффекторной функцией.

Получают антитела с бисекционными олигосахаридами, например, антитела, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, бисекционнируется с помощью GlcNAc. Такие антитела могут отличаться пониженным фукозилированием и/или повышенной ADCC-функцией. Примеры указанных вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (на имя Jean-Mairet с соавторами); US № 6602684 (на имя Umana с соавторами) и US 2005/0123546 (на имя Umana с соавторами).

Антитела к FAP могут иметь повышенное относительное содержание бисекционных олигосахаридов в Fc-области в результате модификации их олигосахаридов. Процент бисекционных N-связанных олигосахаридов в Fc-области антител к FAP может составлять по меньшей мере от примерно 10 до примерно 100%, в частности, по меньшей мере примерно 50%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90-95% от общего содержания олигосахаридов. Бисекционные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа.

Антитела к FAP также могут иметь повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области в результате модификации их олигосахаридов. При этом процент нефукозилированных олигосахаридов может составлять от по меньшей мере примерно 20 до примерно 100%, в частности по меньшей мере примерно 50%, предпочтительно от по меньшей мере примерно 60 до примерно 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 75%. Нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа.

Количество фукозы определяют, рассчитывая среднее количество фукозы в сахарной цепи на Asn297, относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), осуществляя измерения с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии согласно методу описанному в WO 2008/077546). Asn297 обозначает остаток аспарагина, локализованный в положении 297 в Fc-области (согласно EU-нумерации остатков в Fc); однако Asn297 может быть локализован в пределах примерно ± 3 аминокислоты в обратном или прямом направлении относительно положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, что связано с минорными вариациями в последовательности антител. Относительное количество фукозы представляет собой процент содержащих фукозу структур относительно всех гликоструктур, идентифицированных в обработанном N-гликозидазой F образце (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-МС. Указанные варианты фукозилирования могут обладать повышенной ADCC.

Методология гликоинженерии, которую можно применять для антител к FAP, описана подробно в US № 6602684, опубликованной заявке на патент США № 2004/0241817 A1, опубликованной заявке на патент США 2003/0175884 A1, предварительной заявке на патент США № 60/441307 и WO 2004/065540, полное содержание каждого документа включено в настоящее описание в качестве ссылки. Антитела к FAP можно подвергать гликоинженерии таким образом, чтобы они имели пониженное количество фукозных остатков в Fc-области, с использованием методик, описанных в опубликованной заявке на патент США № 2003/0157108 (на имя фирмы Genentech) или EP 1176195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 и опубликованных заявках на патент США №№ 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140, у Niwa и др., J Immunol Methods 306, 2006, сс. 151-160, в US № 6946292 (на имя фирмы Kyowa). Сконструированные с помощью гликоинженерии антитела к FAP можно получать также в экспрессионных системах, которые продуцируют модифицированные гликопротеины, например, описанных в опубликованной заявке на патент США № 60/344169 и WO 03/056914 (на имя фирмы GlycoFi, Inc.) или WO 2004/057002 и WO 2004/024927 (на имя фирмы Greenovation).

Дополнительными примерами публикаций, касающихся "дефукозилированных" вариантов антител или вариантов антител "с дефицитом фукозы" являются WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2002/0164328; US 2004/0109865; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki и др., J. Mol. Biol. 336, 2004, сс. 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng. 87, 2004, с. 614). Примерами клеточных линий, которые обладают способностью продуцировать дефукозилированные антитела, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозилирования (Ripka и др., Arch. Biochem. Biophys. 249, 1986, сс. 533-545; заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, на имя Presta L; и WO 2004/056312 A1, на имя Adams с соавторами, прежде всего в примере 11), и клеточные линии с "выключенным" геном, например, CHO-клетки с "выключенным" геном альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng. 87, 2004, с. 614); Kanda Y. и др., Biotechnol. Bioeng., 94(4), 2006, сс. 680-688; и WO 2003/085107).

Антитела к FAP могут иметь повышенное относительное содержание бисекционных нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области. Бисекционные нефукозилированные олигосахариды могут быть либо гибридными, либо комплексными. В частности, можно получать антитела к FAP, в которых по меньшей мере от примерно 10 до примерно 100%, предпочтительно по меньшей мере примерно 15%, более предпочтительно по меньшей мере от примерно 20 до примерно 25% и наиболее предпочтительно от по меньшей мере примерно 30 до примерно 35% олигосахаридов в Fc-области антигенсвязывающей молекулы являются бисекционными нефукозилированными. Антитела к FAP также могут содержать Fc-

область, в которой по меньшей мере от примерно 10 до примерно 100%, предпочтительно по меньшей мере примерно 15%, более предпочтительно по меньшей мере от примерно 20 до примерно 25% и наиболее предпочтительно от по меньшей мере примерно 30 до примерно 35% олигосахаридов в Fc-области антитела являются бисекционными гибридными нефукозилированными.

Антитело можно изменять для повышения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создают или удаляют один или несколько сайтов гликозилирования.

Известны также варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахаридах, присоединенном к Fc-области. Указанные варианты антител могут обладать повышенной CDC-функцией. Указанные варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (на имя Patel с соавторами); WO 1998/58964 (на имя Raju S.) и WO 1999/22764 (на имя Raju S.).

Для повышения ADCC или других эффекторных функций антител к FAP, можно также повышать'affинность антигенсвязывающей молекулы к FAP, например, путем созревания'affинности или других методов повышения'affинности (см., Tang и др., J. Immunol. 179, 2007, сс. 2815-2823) или с помощью аминокислотных модификаций в Fc-области, описанных ниже. Согласно настоящему изобретению можно применять также комбинации этих подходов.

в) Варианты Fc-области

Можно интродуцировать в Fc-область антитела, одну или несколько аминокислотных модификаций, создавая тем самым вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческой Fc-области (например, Fc-области человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), включающую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

Вариант антитела может обладать некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его перспективным кандидатом для путей применения, для которых является важным время полужизни антитела *in vivo*, однако некоторые эффекторные функции (такие как связанные с комплементом и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными. Можно осуществлять анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения снижения/истощения CDC- и/или ADCC-активности. Например, можно осуществлять анализы связывания Fc-рецептора (FcR) для гарантии того, что у антитела отсутствует способность к связыванию с FcγR (и поэтому, вероятно, отсутствует ADCC-активность), но сохраняется способность связываться с FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, т.е. NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные об экспрессии FcR на гематопозитических клетках обобщены в табл. 3 на с. 464 у Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492. Примеры анализов *in vitro* (но, не ограничиваясь только ими) ADCC-активности представляющей интерес молекулы описаны в US № 5500362 (см., например, Hellstrom I. и др., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom I. и др., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82, 1985, сс. 1499-1502); № 5821337 (см., Bruggemann M. и др., J. Exp. Med. 166, 1987, сс. 1351-1361). В альтернативном варианте можно применять нерадиоактивные методы (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТГ[™] на основе проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и

нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин). Пригодными для таких анализов эффекторными клетками являются моноклеарные клетки периферической крови (ПБМК) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, например, как описано у Clynes и др., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95, 1998, сс. 652-656). Можно осуществлять также анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело не может связывать C1q и поэтому у него отсутствует CDC-активность (см., например, описание ELISA для оценки связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять CDC-анализ (см., например, Gazzano-Santoro и др., J. Immunol. Methods 202, 1996, с. 163; Cragg M.S. и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052; и Cragg M.S. и M.J. Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743). Определения FcRn-связывания и клиренса/времени полужизни *in vivo* можно осуществлять также с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. и др., Int'l. Immunol. 18(12), 2006, сс. 1759-1769).

Антитела с пониженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или нескольких следующих остатков в Fc-области: 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (US № 6737056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве аминокислот в положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант "DANA" Fc-области, несущий замену остатков 265 и 297 на аланин (US № 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, US № 6737056; WO 2004/056312 и Shields и др., J. Biol. Chem. 9(2), 2001, сс. 6591-6604).

Вариант антитела может содержать Fc-область с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые повышают ADCC, например, замены в положениях 298, 333, и/или 334 Fc-области (EU-нумерация остатков).

В Fc-области также осуществляют изменения, которые приводят к измененной (т.е. либо повышенной, либо пониженной) способности связывать C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), что описано, например, в US № 6194551, WO 99/51642 и у Idusogie и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184.

Антитела с удлинённым временем полужизни и повышенной способностью к связыванию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., J. Immunol. 117, 1976, с. 587 и Kim и др., J. Immunol. 24, 1994, с. 249), описаны в US № 2005/0014934A1 (на имя Hinton с соавторами.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые повышают связывание Fc-области с FcRn. Указанные варианты Fc включают варианты с заменами одного или нескольких следующих остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замену остатка 434 в Fc-области (US № 7371826).

Дополнительные примеры, касающиеся вариантов Fc-области, описаны также в заявках на патент США №№. 60/439498; 60/456041; 60/514549 или в WO 2004/063351 (вариант Fc-областей с повышенной аффинностью связывания в результате аминокислотной модификации); или в заявке на патент США № 10/672,280 или в WO 2004/099249 (варианты Fc с измененной способностью к связыванию с FcγR в результате аминокислотной модификации), у Duncan и Winter, Nature 322, 1988, сс. 738-740; в US № 5648260; US № 5624821 и WO 94/29351.

г) Сконструированные с использованием цистеина варианты антител

Иногда желательно конструирование антитела с использованием цистеина, например, «тиоМАт», в которых один или несколько остатков в антителе заменены на остатки цистеина. Замененные остатки, как правило, присутствуют в доступных сайтах антитела. Путем замены указанных остатков на цистеин реактивные тиольные группы вносятся в доступные сайты антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственных средств или фрагменты линкера - лекарственного средства, для создания конъюгата антитела. Любой один или несколько следующих остатков можно заменять на цистеин: V205 (нумерации по Кэботу) легкой цепи; A118 (EU-нумерация) тяжелой цепи; и S400 (EU-нумерация) Fc-области тяжелой цепи. Сконструированные с помощью цистеина антитела можно создавать, например, согласно методу, описанному в US № 7521541.

д) Производные антител

Антитело дополнительно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, известные в данной области и легкодоступные. Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но, не ограничиваясь только ими) водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но, не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться и, если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но, не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антитела, подлежащего усовершенствованию, предполагается ли применение производного антитела в терапии в определенных условиях, и т.д.

Конъюгаты антитела и небелкового фрагмента можно избирательно нагревать, воздействуя на него излучением. Причем небелковый фрагмент может представлять собой углеродную нанотрубку (Kam и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает (но, не ограничиваясь только ими) длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой клетки, ближайшие к конъюгату: антитело-небелковый фрагмент, уничтожаются.

Б. Методы рекомбинации и композиции

Антитела можно получать с использованием методов рекомбинации и композиций, например, описанных в US № 4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело к FAP. Указанный полинуклеотид может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). Один или несколько векторов (например, клонирующие векторы или экспрессионные векторы) могут содержать указанный полинуклеотид. Клетка-

хозяин, содержащая указанный полинуклеотид или указанный вектор, включает (например, является трансформированной с помощью указанных векторов): (1) вектор, включающий полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, полицистронный вектор), или (2) первый вектор, включающий полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, включающий полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. Она может представлять собой эукариотическую клетку, прежде всего клетку млекопитающего, например, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку почки детеныша хомяка (BHK) или лимфоидную клетку (например, клетку Y0, NS0, Sp20). При этом способ получения антитела к FAP, предусматривает культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, который кодирует антитело в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательное выделение антитела из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антитела к FAP один или несколько полинуклеотид(ов), который(ые) кодирует(ют) антитело, например, описанное выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Можно применять методы, хорошо известные специалистам в данной области, для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность антитела к FAP наряду с соответствующими контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают методики *in vitro* рекомбинантной ДНК, методики синтеза и методики *in vivo* рекомбинации/генетической рекомбинации (см., например, методики, описанные у Maniatis и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).

Один или несколько полинуклеотидов, кодирующих антитело к FAP, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или в другом варианте в регулируемой экспрессионной системе. Приемлемыми регулируемые экспрессионными системами являются (но, не ограничиваясь только ими) регулируемая тетрациклином экспрессионная система, индуцируемая экдизоном экспрессионная система, регулируемая *lac* экспрессионная система, индуцируемая глюкокортикоидом экспрессионная система, система, включающая индуцируемый температурой промотор, и индуцируемая металлом металлотионеина экспрессионная система. Если несколько различных полинуклеотидов, которые кодируют антитело, входит в систему клетки-хозяина, то некоторые из них могут экспрессироваться под контролем конститутивного промотора, а другие под контролем регулируемого промотора.

Приемлемыми клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих антитела векторов, являются прокариотические или эукариотические клетки, указанные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция не требуются. Данные, касающиеся экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, приведены, например, в US №№ 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также у Charlton, *Methods in Molecular Biology*, под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 245-254, описание экспрессии фрагментов антитела в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и можно дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют антитела, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215). Указанные системы экспрессии предложены также в заявке на патент США № 60/344169 и WO 03/056914 (методы получения напоминающего человеческий гликопротеин в нечеловеческой эукариотической клетке-хозяине).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью OB40 (C0S-7); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки афри-

канской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁻-CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

Стабильная экспрессия, как правило, является более предпочтительной, чем кратковременная экспрессия, поскольку с ее помощью, как правило, получают более воспроизводимые результаты, а также она более пригодна для крупномасштабного производства; однако в компетенции специалиста в данной области является решение вопроса о том, когда для конкретной ситуации более пригодной является кратковременная экспрессия.

Способ модификации профиля гликозилирования антител к FAP, которые продуцируются клеткой-хозяином, как правило, заключается в том, что экспрессируют в клетке-хозяине один или несколько полинуклеотид(ов), кодирующий(их) антитело к FAP, и один или несколько полинуклеотидов, кодирующий(их) полипептид, который обладает гликозилтрансферазной активностью, или вектор, содержащий указанные полинуклеотиды. Как правило, любой тип культивируемой клеточной линии, включая описанные выше клеточные линии, можно применять для создания клеточных линий для производства антител к FAP с измененной схемой гликозилирования. Предпочтительными клеточными линиями являются CHO-клетки, BHK-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы Y0, клетки мышинной миеломы P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы и другие клетки млекопитающих. Полипептиды с гликозилтрансферазной активностью включают $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnTIII), α -маннозидазу II (ManII), $\beta(1,4)$ -галактозилтрансферазу (GalT), $\beta(1,2)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазу I (GnTI) и $\beta(1,2)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазу II (GnTII). В клетке-хозяине можно экспрессировать комбинацию полинуклеотидов, кодирующих гликозилтрансферазную активность (например, GnTIII и Man II) или же один или несколько полинуклеотид(ов), который(ые) кодирует(ют) антитело к FAP, в которой ген гликозилтрансферазы разрушен или иным образом деактивирован (например, в клетке-хозяине, в которой активность гена, кодирующего коровую $\alpha 1$ -6-фукозилтрансферазу, "выключена"). Антитела к FAP можно получать в клетке-хозяине, в которой происходит также экспрессия полинуклеотида, кодирующего полипептид, обладающий GnTIII-активностью, с целью модификации схемы гликозилирования указанных антител. Полипептид, обладающий GnTIII-активностью, обычно представляет собой слитый полипептид, который содержит домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. Экспрессия антитела к FAP может осуществляться в клетке-хозяине, в которой происходит экспрессия полинуклеотида, кодирующего полипептид, обладающий GnTIII-активностью, что приводит к образованию антител к FAP, которые обладают повышенной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или повышенной эффекторной функцией. Итак, клетка-хозяин может содержать (а) один или несколько выделенный(ых) полинуклеотид(ов), содержащий(их) последовательность, которая кодирует полипептид, обладающий GnTIII-активностью; и (б) один или несколько выделенный(ых) полинуклеотид(ов), который(ые) кодирует(ют) антитело к FAP. Причем полипептид, обладающий GnTIII-активностью, может представлять собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII и домен локализации в комплексе Гольджи полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. Предпочтительно домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации в комплексе Гольджи маннозидазы II. Методы создания указанных слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны в WO 2004/065540, в предварительной заявке на патент США № 60/495142 и в опубликованной заявке на патент США 2004/0241817, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Клетка-хозяин дополнительно может содержать выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, обладающей активностью маннозидазы II (ManII).

Полинуклеотид(ы), кодирующий(ие) полипептиды(ы), типа полинуклеотид(ов), кодирующего(их) антитело к FAP, можно экспрессировать под контролем конститутивного промотора или в альтернативном варианте в регулируемой системе экспрессии. Указанные системы хорошо известны в данной области и включают описанные выше системы.

Клетки-хозяева, которые содержат кодирующую последовательность антитела к FAP и/или кодирующую последовательность полипептидов, обладающих гликозилтрансферазной активностью, и которые экспрессируют биологически активные генные продукты, можно определять, например, с помощью гибридизации ДНК-ДНК или ДНК-РНК; по присутствию или отсутствию функций определенных "маркерных" генов; путем оценки уровня транскрипции, измеряемого по экспрессии соответствующих мРНК-транскриптов в клетке-хозяине; или путем выявления генного продукта с помощью иммуоанали-

за или по его биологической активности - т.е. методов, хорошо известных в данной области. Активность GnTIII или Man II можно определять, например, применяя лектин, который связывается с продуктами биосинтеза GnTIII или ManII соответственно. Примером указанного лектина является лектин E₄-PNA, который связывается предпочтительно с олигосахаридами, содержащими двурассекающий GlcNAc. Продукты биосинтеза (т.е. специфические олигосахаридные структуры) полипептидов, обладающих активностью GnTIII или ManII, можно выявлять также с помощью масс-спектрометрического анализа олигосахаридов, высвобождающихся из гликопротеинов, которые продуцируются клетками, экспрессирующими указанные полипептиды. В альтернативном варианте можно использовать функциональный анализ, в котором измеряют повышенную способность связываться с Fc-рецептором или повышенную эффекторную функцию, опосредуемую антителами, которые продуцируются клетками, созданными с использованием полинуклеотида, который кодирует полипептид, обладающий активностью GnTIII.

Способу получения антитела к FAP, которое имеет модифицированные олигосахаридами, заключается в том, что (а) культивируют клетку-хозяина, созданную для экспрессии по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует полипептид, обладающий гликозилтрансферазной активностью, в условиях, которые обеспечивают получение антитела к FAP, где указанный полипептид, обладающий гликозилтрансферазной активностью, экспрессируется в количестве, достаточном для модификации олигосахаридов в Fc-области указанного антитела к FAP, продуцируемого указанной клеткой-хозяином; и (б) выделяют антитело к FAP. Полипептид, обладающий гликозилтрансферазной активностью, представляет собой GnTIII. Возможно присутствие двух полипептидов, обладающих гликозилтрансферазной активностью. Два пептида, обладающих гликозилтрансферазной активностью, представляют собой GnTIII и ManII. Полипептид, обладающий гликозилтрансферазной активностью, может представлять собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII. Слитый полипептид может дополнительно содержать домен локализации в комплексе Гольджи полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. В частности, домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II или GnTI, наиболее предпочтительно домен локализации маннозидазы II. В альтернативном варианте домен локализации в комплексе Гольджи выбирают из группы, включающей: домен локализации маннозидазы I, домен локализации GnTII и домен локализации коровой α 1-6-фукозилтрансферазы.

Модифицированное антитело к FAP, продуцируемое клеткой-хозяином или полученное с помощью способа, описанного выше, может содержать константную область IgG или ее фрагмент, содержащий Fc-область или представлять собой гуманизированное или человеческое антитело или его фрагмент, содержащий Fc-область.

Антитело к FAP с измененной схемой гликозилирования, продуцируемое клеткой-хозяином или полученное с помощью способа, описанного выше, как правило, отличается повышенной аффинностью связывания Fc-рецептора и/или повышенной эффекторной функцией в результате модификации клетки-хозяина (например, в результате экспрессии гена гликозилтрансферазы). Предпочтительно повышенная аффинность связывания Fc-рецептора представляет собой повышенное связывание с активирующим Fc-рецептором, наиболее предпочтительно с Fc γ RIIIa-рецептором. Повышенная эффекторная функция предпочтительно представляет собой повышение одной или нескольких следующих функций: повышенная антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность, повышенный антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), повышенная секреция цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с полиморфоядерными клетками (PMNC), повышенное связывание с моноцитами, повышенное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, повышенная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное созревание дендритных клеток и повышенное Т-клеточное примирование.

В. Анализы

Антитела к FAP можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности различными анализами, известными в данной области.

1. Анализы связывания и другие анализы

Антитело можно тестировать в отношении его антигенсвязывающей активности, например, с помощью известных методов, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг и т.д.

Можно также использовать анализы в конкурентном формате для идентификации антитела, которое конкурирует с другим специфическим антителом к FAP за связывание с FAP. Такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается другое специфическое антитело к FAP. Подробное описание примеров методов картирования эпитопов, с которыми связывается антитело, представлено у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в: *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996.

Например, при осуществлении анализа в конкурентном формате иммобилизованный FAP инкуби-

руют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с FAP (например, антитело 3F2, описанное в примерах), и второе немеченое антитело, у которого оценивают способность конкурировать с первым антителом за связывание с FAP. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридом. В качестве контроля иммобилизованный FAP инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с FAP, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, ассоциированной с иммобилизованным FAP. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным FAP, существенно понижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с FAP (см. Harlow и Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

2. Анализы активности

Эти методы анализа предназначены для идентификации антител к FAP, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может представлять собой, например, лизис клеток-мишеней, антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или индукцию апоптоза.

Антитело тестируют в отношении указанной биологической активности. Примеры анализов, предназначенных для тестирования ADCC, описаны выше (см., например, раздел "Определения": "Антитела, обладающие повышенной ADCC") и в примере 11. Анализы, предназначенные для оценки лизиса клеток (например, на основе оценки высвобождения LDH) или апоптоза (например, с помощью TUNEL-анализа) хорошо известны в данной области. Анализы, предназначенные для измерения ADCC или CDC, описаны также в WO 2004/065540 (см. пример 1 в указанной заявке), полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Г. Конъюгаты антител

Конъюгаты содержат антитело к FAP, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические или лекарственные средства, ингибиторы роста, токсины (например, белковые токсины, обладающие ферментативной активностью токсины бактерий, грибов, растений или животных или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В конъюгате антитело-лекарственное средство (ADC) антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными средствами, включая (но, не ограничиваясь только ими) майтансиноид (см. US №№ 5208020, 5416064 и европейский патент EP 0425235 B1); ауристин, такой как лекарственное средство на основе монометилауристатина с фрагментами DE и DF (MMAE (малеимидакапроил-монометилауристин E) и MMAF (монометилауристин F)) (см. US №№ 5635483, 5780588 и 7498298); доластин; калихеамицин или его производные (см. US №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman и др., *Cancer Res.* 53, 1993, сс. 3336-3342; и Lode и др., *Cancer Res.* 58, 1998, сс. 2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz и др., *Current Med. Chem.* 13, 2006, сс. 477-523; Jeffrey и др., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16, 2006, сс. 358-362; Torgov и др., *Bioconj. Chem.* 16, 2005, сс. 717-721; Nagy и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2000, сс. 829-834; Dubowchik и др., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12, 2002, сс. 1529-1532; King и др., *J. Med. Chem.* 45, 2002, сс. 4336-4343 и US № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тесетаксел и ортатаксел; трихотекен и CC1065.

Конъюгат антитела может содержать антитело, конъюгированное с обладающим ферментативной активностью токсином или его фрагментом, включая (но, не ограничиваясь только ими) цепь A дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь A экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь A рицина, цепь A абрина, цепь A модеццина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

Возможно, что конъюгат антитела содержит антитело, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для получения радиоконъюгатов можно применять широкое разнообразие радиоактивных изотопов. Их примерами являются At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоконъюгат применяют для целей выявления, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например, ^{99m}Tc или ^{112}In , или спин-метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (который называют также магнитно-резонансной томографией, МРТ), например, йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты, включающие антитело и цитотоксический агент, можно создавать с использованием целого ряда бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметил-адипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидосоединения (такие как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производ-

ные бисдиазония (такие как бис(пара-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина можно получать согласно методу, описанному у Vitetta и др., Science, 238, 1987, с. 1098. Меченная с помощью C^{14} 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO 94/11026). Линкер может представлять собой "отщепляемый ликер", который облегчает высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно применять неустойчивый в кислой среде линкер, чувствительный к действию пептидаз линкер, фотолabile линкер, диметильный линкер или содержащий дисульфид линкер (Chari и др., Cancer Res. 52, 1992, сс. 127-131; US № 5208020).

Конъюгаты антител представляют собой прежде всего (но, не ограничиваясь только ими) конъюгаты, полученные с использованием перекрестносшивающих агентов, включая (но, не ограничиваясь только ими) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфид-EMCS, сульфид-GMBS, сульфид-KMUS, сульфид-MBS, сульфид-SIAB, сульфид-SMCC и сульфид-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые поступают в продажу (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, шт. Иллинойс, США).

Д. Способы и композиции для диагностики и выявления

Любое из антител к FAP можно применять для выявления присутствия FAP в биологическом образце. Понятие "выявление" в контексте настоящего описания предусматривает количественное или качественное определение. Биологический образец представляет собой клетку или ткань, например, клетки или ткани из головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, почки, печени, легкого, яичника, поджелудочной железы, предстательной железы, скелетной мышцы, кожи, тонкого кишечника, желудка или матки, включая также клетки или ткани опухолей указанных органов.

Биологический образец, необязательно в сочетании с контрольным образцом, приводят в контакт с антителом к FAP, в условиях, пригодных для связывания антитела к FAP с FAP, и выявляют образование комплекса между антителом к FAP и FAP. Указанный способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*. Антитело к FAP также применяют для отбора индивидуумов, которых можно лечить с помощью антитела FAP, например, если FAP является биомаркером для отбора пациентов.

Примерами нарушений, которые можно диагностировать с помощью антитела, предлагаемого в изобретении, являются нарушения, ассоциированные с экспрессией FAP, такие как рак и некоторые воспалительные состояния.

Способ диагностирования заболевания у индивидуума, как правило, заключается в том, что вводят указанному индивидууму в эффективном количестве диагностический агент, при этом диагностический агент содержит антитело к FAP и метку - визуализирующее средство, что позволяет выявлять комплекс диагностического агента и FAP.

Антитела к FAP можно метить. Метки представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) метки или фрагменты, которые выявляют непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или легенды, которые выявляют косвенным путем, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Примерами меток являются (но, не ограничиваясь только ими) радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , 3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидаза из хрена (HRP), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахараина, например глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, оксидазы гетероциклических соединений, такие как уреказа и ксантиноксидаза, комплексы с ферментом, в которых применяют перекись водорода для окисления предшественника красителя, такого, например, как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спин-метки, бактериофаги в качестве меток, стабильные свободные радикалы и т.п.

Е. Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции антитела к FAP получают путем смешения антитела, имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. A. Osol, 1980) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, они включают (но, не ограничиваясь только ими) буферы, такие как фосфатный, цитратный, ацетатный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полиме-

ры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В контексте настоящего описания фармацевтически приемлемые носители включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидаз (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе gHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. sHASEGP можно объединять с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в US № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в US № 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции включают гистидин-ацетатный буфер.

Композиция может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно вещества с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Например, если подлежащее лечению заболевание представляет собой рак, то может оказаться желательным дополнительно применять одно или несколько противораковых средств, например, химиотерапевтическое средство, ингибитор пролиферации опухолевых клеток или активатор апоптоза раковых клеток. Такие действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для решения поставленной задачи.

Действующие вещества можно включать также в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. A. Osol, 1980.

Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антитело, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы.

Композиции, предназначенные для применения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко можно осуществлять путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

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

Ж. Способы и композиции для терапевтического применения

Любые антитела к FAP или фармацевтические композиции, содержащие антитела к FAP, можно применять в терапевтических методах.

Антитела к FAP можно применять для лечения заболеваний, отличающихся экспрессией FAP, прежде всего аномальной экспрессией (например, сверхэкспрессией или другой схемой экспрессии в клетке) FAP по сравнению со здоровой тканью из клеток такого же типа. Аномальная экспрессия FAP (например, сверхэкспрессия) характерна для многих человеческих опухолей по сравнению с неопухолевой тканью из клеток такого же типа. Так, антитела к FAP можно применять для предупреждения образования опухолей, уничтожения опухолей и ингибирования роста опухолей или метастазов. Антитела к FAP можно применять для лечения любой опухоли, экспрессирующей FAP. Конкретными злокачественными заболеваниями, которые можно лечить с помощью антител к FAP, представленных в настоящем описании, являются, например, рак легкого, рак ободочной кишки, рак желудка, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак почки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак скелетной мускулатуры.

Антитела к FAP можно применять для ингибирования роста опухоли или уничтожения опухолевых клеток. Например, антитела к FAP могут связываться с FAP, который находится на мембране или клеточной поверхности раковых клеток (опухолевые клетки или клетки стромы опухоли) и вызывать, например, ADCC или другое опосредуемое эффектором уничтожение раковых клеток.

В альтернативном варианте антитела к FAP можно применять для блокады функции FAP, прежде всего путем физического интерферирующего воздействия на его связывание с другим соединением. На-

пример, антигенсвязывающие молекулы можно применять для блокады ферментативной активности FAP (например, активности сериновой пептидазы, желатиназы, коллагеназы), опосредуемого FAP расщепления компонентов внеклеточного матрикса (ECM) и/или опосредуемой FAP инвазии или миграции клеток.

Антитела к FAP могут использоваться в способе лечения индивидуума, страдающего заболеванием, отличающимся экспрессией FAP, который заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к FAP. Индивидууму также могут вводить в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, описанное ниже. Антитело к FAP можно использовать для индукции лизиса клетки, т.е. в способе индукции лизиса клетки у индивидуума, который заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к FAP для индукции лизиса клетки. "Индивидуум" в контексте изобретения предпочтительно представляет собой человека. "Заболевание, отличающееся экспрессией FAP", в контексте данного изобретения предпочтительно представляет собой рак, наиболее предпочтительно рак, выбранный из группы, включающей рак легкого, рак ободочной кишки, рак желудка, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак почки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак скелетной мускулатуры. "Клетка" предпочтительно представляет собой клетку, присутствующую в опухоли, например опухолевую клетку или клетку стромы опухоли, наиболее предпочтительно опухолевую клетку. "Экспрессия FAP" предпочтительно представляет собой аномальную экспрессию, например, сверхэкспрессию или другую схему экспрессии в клетке, по сравнению со здоровой тканью из клеток такого же типа.

Антитела к FAP используются для производства или приготовления лекарственного средства. Это лекарственное средство предназначено для лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP, или для применения в способе лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP, который заключается в том, что вводят индивидууму, который страдает заболеванием, отличающимся экспрессией FAP, лекарственное средство в эффективном количестве. Этот способ заключается также в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, описанное ниже. Данное лекарственное средство предназначено для индукции лизиса клетки или для применения в способе индукции лизиса клетки у индивидуума, который заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к FAP для индукции лизиса клетки. "Индивидуум" предпочтительно представляет собой человека. "Заболевание, отличающееся экспрессией FAP" предпочтительно представляет собой рак, наиболее предпочтительно рак, выбранный из группы, включающей рак легкого, рак ободочной кишки, рак желудка, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак почки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак скелетной мускулатуры. "Клетка" предпочтительно представляет собой клетку, присутствующую в опухоли, например опухолевую клетку или клетку стромы опухоли, наиболее предпочтительно опухолевую клетку. "Экспрессия FAP" предпочтительно представляет собой аномальную экспрессию, например сверхэкспрессию или другую схему экспрессии в клетке, по сравнению со здоровой тканью из клеток такого же типа.

Способ лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP, заключается в том, что вводят индивидууму, который страдает указанным заболеванием, отличающимся экспрессией FAP, в эффективном количестве антитело к FAP. Он заключается также в том, что индивидууму дополнительно вводят в эффективном количестве по меньшей мере одно терапевтическое средство, например, описанное ниже. Способ индукции лизиса клетки у индивидуума заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к FAP для индукции лизиса клетки. "Индивидуум" может представлять собой человека. "Заболевание, отличающееся экспрессией FAP" предпочтительно представляет собой рак, наиболее предпочтительно рак, выбранный из группы, включающей рак легкого, рак ободочной кишки, рак желудка, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак почки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак скелетной мускулатуры. "Клетка" предпочтительно представляет собой клетку, присутствующую в опухоли, например опухолевую клетку или клетку стромы опухоли, наиболее предпочтительно опухолевую клетку. "Экспрессия FAP" представляет собой аномальную экспрессию, например сверхэкспрессию или другую схему экспрессии в клетке, по сравнению со здоровой тканью из клеток такого же типа.

Фармацевтические композиции, содержащие антитело к FAP, применяются в любом из указанных выше терапевтических способов. Она содержит любое из антител к FAP, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Она также может содержать любое из антител к FAP и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, описанное ниже.

Антитела для лечения можно применять либо индивидуально, либо в сочетании с другими агентами. Например, антитело можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое средство, например, химиотерапевтическое средство, ингибитор пролиферации опухолевых клеток или апоптоза опухолевых клеток.

Такие комбинированные терапии, указанные выше, предусматривают совместное введение (когда

два или большее количество терапевтических средств включены в одну и ту же или различные композиции) и раздельное введение, в каждом случае введение антитела можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства или адъюванта. Антитела можно также применять также в сочетании с лучевой терапией.

Антитело (и любое дополнительное терапевтическое средство), можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, внутрилегочный и интраназальный и при необходимости применять для местной обработки, введения в повреждение. Парентеральное введение включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Внутривенное введение, как правило, является предпочтительным. Однако, по-видимому, внутрибрюшинный путь должен являться наиболее предпочтительным, например, при лечении колоректальных опухолей. Дозирование можно осуществлять любым приемлемым путем, например путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, в том числе, от того, является ли лечение кратковременным или хроническим. Можно применять различные схемы дозирования, включая (но, не ограничиваясь только ими) однократное или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Антитела можно включать в состав композиций, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. Антитело можно, но это не является обязательным, включать в композицию в сочетании с одним или несколькими другими агентами, которые в настоящее время применяют для лечения рассматриваемого заболевания. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в количестве, составляющем от 1 до 99% от дозы, указанной в настоящем описании, или в любой дозе и с помощью любого пути, который по данным эмпирической/клинической оценки является пригодным.

Для предупреждения или лечения заболевания приемлемая доза антитела (при его применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, серьезности и течения болезни, применяют ли антитело для превентивных или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или в виде серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) антитела может представлять собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например, с помощью одной или нескольких отдельных обработок или с помощью непрерывной инфузии. Одним из примеров типичных суточных доз может являться доза, составляющая от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. При использовании повторных введений в течение нескольких дней или более длительного периода времени, в зависимости от состояния, лечение, как правило, следует продолжать до достижения подавления симптомов заболевания. Одним из примеров доз антитела является доза, составляющая от примерно 0,05 до примерно 10 мг/кг. Так, пациенту можно вводить одну или несколько следующих доз: примерно 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить дробно, например каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати, например, примерно шесть доз антитела). Можно применять начальную повышенную ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. Однако можно применять другие схемы введения доз. С помощью общепринятых методов и анализов можно легко осуществлять мониторинг действия указанной терапии.

Очевидно, что любые из вышеуказанных комбинаций или терапевтических методов можно применять с использованием конъюгата антитела вместо или в дополнение к антителу к FAP.

3. Изделия

Изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений, представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые размещены на контейнере или вложены в него. Приемлемыми контейнерами являются, например, банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антитело. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковке указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция

содержит антитело; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковке, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Как должно быть очевидно, любое из указанных выше изделий может включать конъюгат антитела вместо или в дополнение к антителу к FAP.

III. Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, можно осуществлять на практике различные другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше описания изобретения в целом.

Пример 1. Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей. Последовательности ДНК определяли посредством секвенирования двух цепей. В некоторых случаях требуемые сегменты генов создавали на фирме Geneart AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов посредством автоматического синтеза генов. Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми рестриктазами, клонировали в плазмидах pGA18 (ampR). Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и определяли концентрацию с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах.

Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у: Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во NIH, публикация No 91-3242, 1991. Для экспрессии все конструкции обозначали, начиная с 5'-концевой ДНК-последовательности, кодирующей лидерный пептид, который придает белкам способность секретироваться в эукариотических клетках. В SEQ ID NO: 323-331 представлены примеры лидерных пептидов и полинуклеотидных последовательностей, кодирующих их.

Получение (созданных с помощью гликоинженерии) антител

Последовательности ДНК тяжелых и легких цепей полноразмерного антитела получали субклонированием переменных областей в рамке считывания либо с константной областью тяжелой цепи, либо константной областью легкой цепи, предварительно встроенной в соответствующий экспрессионный вектор млекопитающих (вектор-реципиент). Экспрессия находилась под контролем промотора MPSV, и вектор нес синтетическую сигнальную последовательность поли-А-хвоста на 3'-конце CDS. Кроме того, каждый вектор содержал OriP-последовательность EBV.

Антитела получали путем котрансфекции клеток линии HEK293-EBNA экспрессионными векторами млекопитающих, предназначенными для экспрессии антител, используя опосредуемую фосфатом кальция трансфекцию. Находящиеся на экспоненциальной фазе роста клетки линии HEK293-EBNA трансфектировали с помощью метода, предусматривающего применение фосфата кальция. В другом варианте HEK293-клетки, выращенные в виде суспензионной культуры, трансфектировали полиэтиленмином (ПЭИ). Для получения немодифицированного не подвергнутого гликоинженерии антитела клетки трансфектировали только экспрессионными векторами тяжелой и легкой цепи антитела в соотношении 1:1.

Для получения антител, подвергнутых гликоинженерии, клетки котрансфектировали двумя дополнительными плазмидами, одна из которых предназначена для экспрессии слитого полипептида, обладающего GnTIII-активностью (экспрессионный вектор GnT-III), а вторая предназначена для экспрессии маннозидазы II (экспрессионный вектор маннозидазы II из комплекса Гольджи) в соотношении 4:4:1:1 соответственно. Клетки выращивали в виде прикрепленных монослойных культур в Т-колбах, используя культуральную среду DMEM, дополненную 10% FCS, и осуществляли их трансфекцию при конфлюэнтности от 50 до 80%. Для трансфекции за 24 ч до осуществления трансфекции в T150-колбу высевали 15 млн клеток в 25 мл культуральной среды DMEM, дополненной FCS (конечная концентрация 10 об.%), и клетки выдерживали при 37°C в течение ночи в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Для трансфекции каждой T150-колбы приготавливали раствор, содержащий ДНК, CaCl₂ и воду, путем смешения 94 мкг общей плазмидной ДНК вектора, взятой поровну из экспрессионных векторов легкой и тяжелой цепи, воды до конечного объема 469 мкл и 469 мкл раствора 1M CaCl₂. К этому раствору добавляли раствор, содержащий 938 мкл 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1,5mM Na₂HPO₄, pH 7,05, немедленно перемешивали в течение 10 с и давали выстояться при комнатной температуре в течение 20 с. Суспензию разводили 10 мл среды

DMEM, дополненной 2% FCS, и вносили в T150-колбу вместо находящейся в ней среды. Затем дополнительно вносили 13 мл среды для трансфекции. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение примерно 17-20 ч, затем среду заменяли 25 мл DMEM, 10% FCS. Кондиционированную среду собирали примерно через 7 дней после замены среды путем центрифугирования в течение 15 мин при 210×g, раствор стерилизовали фильтрацией (фильтр 0,22 мкм) и добавляли азид натрия в конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Секретируемые антитела дикого типа или афукозилированные, созданные с помощью гликоинженерии антитела очищали из супернатантов клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии с использованием белка A (HiTrap ProtA, фирма GE Healthcare). В целом, метод состоял в следующем: колонку уравнивали 20мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, pH 7,5, вносили супернатант клеток, затем осуществляли первую отмывку, используя 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, pH 7,5 и вторую отмывку, используя 13,3 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 500 мМ хлорид натрия, pH 5,45. Антитела элюировали 20 мМ цитратом натрия, 100 мМ хлоридом натрия, 100 мМ глицином, pH 3. При осуществлении последующей стадии гель-фильтрации на колонке HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare) заменяли буфер на раствор, содержащий 25мМ фосфат калия, 125мМ хлорид натрия, 100мМ глицин, pH 6,7, или в другом варианте на буфер, содержащий 140мМ хлорид натрия, 20мМ гистидин, pH 6,0, и собирали чистые мономерные антитела типа IgG1. При необходимости между двумя стандартными стадиями очистки осуществляли дополнительную стадию катионообменной хроматографии.

Концентрацию белка в очищенных белковых образцах определяли, измеряя оптическую плотность (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу антител анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5мМ 1,4-дитиотреитол) и без него и осуществляли окрашивание кумасси (SimpleBlue™ SafeStain фирма Invitrogen). Систему геля NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen, США) применяли согласно инструкции производителя (4-20% трис-глициновые гели или 3-12% Бис-Трис). Содержание агрегатов в образцах антител анализировали с помощью аналитической колонки для гель-фильтрации Супердекс200 10/300GL (фирма GE Healthcare, Швеция) и подвижного буфера 2мМ MOPS, 150мМ NaCl, 0,02% NaN₃, pH 7,3 при 25°C. Целостность аминокислотного каркаса восстановленных легких и тяжелых цепей антитела подтверждали с помощью масс-спектрометрии с использованием наноэлектроспрея (NanoElectrospray Q-TOF) после удаления N-гликанов путем обработки ферментом гликозидазой F пептида-N (фирма Roche Molecular Biochemicals).

Результаты очистки и анализа антител дикого типа и созданных с помощью гликоинженерии человеческих антител IgG-типа 28H1, 29B11, 3F2 и 4G8 представлены на фиг. 15-22. Данные о выходе приведены в следующей таблице:

	Выход [мг/л]	
	Дикий тип	Созданное с помощью гликоинженерии
28H1 hu IgG	46	40
29B11 hu IgG	10	14
3F2 hu IgG	144	7
4G8 hu IgG	55	12,6

Олигосахариды, связанные с Fc-областью антител, анализировали с помощью описанного ниже метода MALDI TOF-МС. Олигосахариды высвобождали из антител путем расщепления ферментом PNG-азой F. Полученный после расщепления раствор, содержащий высвободившиеся олигосахариды, либо непосредственно подготавливали для анализа с помощью MALDI TOF-МС, либо дополнительно расщепляли гликозидазой EndoH перед подготовкой образца для анализа с помощью MALDI TOF-МС.

Анализ гликоструктуры (созданных с помощью гликоинженерии) антител Для определения относительных соотношений содержащих фукозу и не содержащих фукозу (афукозилированных) олигосахаридных структур высвободившиеся гликаны очищенных образцов антител анализировали с помощью MALDI-ToF-масс-спектрометрии. Образец антитела (примерно 50 мкг) инкубировали в течение ночи при 37°C с 5 мед. N-гликозидазы F (фирма QAbio; PNG-аза F: E-PNG01) в 2 мМ Трис, pH 7,0 для высвобождения олигосахарида из белкового каркаса. Для деаминирования гликанов добавляли уксусную кислоту до конечной концентрации 150 мМ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Для анализа с помощью MALDI TOF-масс-спектрометрии 2 мкл образца смешивали на MALDI-мишени с 2 мкл матричного раствора DHB (2,5-дигидробензойная кислота (фирма Bruker Daltonics, № 201346), растворенной в смеси 50% этанола/5мМ NaCl при 4 мг/мл), и анализировали с помощью MALDI TOF-масс-спектрометра Autoflex II (фирма Bruker Daltonics). Как правило, в одном эксперименте получали и обобщали 50-300 изображений. Полученные спектры оценивали с помощью программы для flex-анализа (фирма Bruker Daltonics) и массы определяли для каждого обнаруженного пика. Затем пики оценивали в отношении содержащих фукозу и не содержащих фукозу (нефукозилированных) структур путем сравнения рассчитанных масс и теоретически ожидаемых масс для соответствующих структур (например, комплексных, гибридных).

ных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур соответственно с фукозой и без фукозы).

Для определения относительного содержания гибридных структур образцы антител расщепляли одновременно с помощью N-гликозидазы F и эндогликозидазы H (фирма QAbio; EndoH: E-EH02). N-гликозидаза F обеспечивает высвобождение всех N-связанных структур гликанов (комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур) из белкового каркаса, а эндогликозидаза H расщепляет все гибридные типы гликанов дополнительно между двумя остатками N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) на редуцирующем конце гликана. Этот продукт расщепления затем обрабатывали и анализировали с помощью MALDI TOF-масс-спектрометрии так же, как описано выше для расщепления образца N-гликозидазой F. Путем сравнения схемы, полученной в результате расщепления N-гликозидазой F и в результате расщепления комбинацией N-гликозидаза F/Endo H, уровень снижения сигналов конкретной углеводной структуры применяли для определения относительного содержания гибридных структур. Относительное содержание каждой углеводной структуры рассчитывали из соотношения высоты пика индивидуальной структуры и суммы высот пиков всех обнаруженных олигосахаридов. Количество фукозы определяли как процент содержащих фукозу структур относительно всех углеводных структур, идентифицированных в образце, обработанном N-гликозидазой F (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур соответственно). Количество нефукозилированных структур определяли как процент структур, в которых отсутствовала фукоза, относительно всех углеводных структур, идентифицированных в образце, обработанном N-гликозидазой F (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур соответственно).

Уровни нефукозилированных структур различных антител дикого типа и созданных с помощью гликоинженерии антител к FAP представлены в следующей таблице:

Антитело	Нефукозилированные структуры [%]	
	Дикий тип	Созданное с помощью гликоинженерии
Hu IgG 28H1	10	40
Hu IgG 29B11	5	27
Hu IgG 3F2(YS)	2,4	64
Hu IgG 4G8	3,8	78

Пример 2. Конструирование характерных для определенного класса Fab-библиотек

Характерные для определенного класса антител библиотеки в Fab-формате конструировали на основе генов человеческой зародышевой линии, используя следующие варианты спаривания V-области: Vk3_20 легкой каппа-цепи с VH3_23 тяжелой цепи для библиотеки DP47-3 и Vk1_17 легкой каппа-цепи с VH1_69 тяжелой цепи для библиотеки DP88-3 (см. SEQ ID NO: 1 и 2).

Обе библиотеки рандомизировали касательно CDR3 легкой цепи (L3) и CDR3 тяжелой цепи (H3) и осуществляли сборку, используя по 3 фрагмента на библиотеку, с помощью сплайсинга с использованием перекрывающихся удлиняющих сегментов (SOE). Фрагмент 1 содержал 5'-конец гена антитела, включая рандомизированный L3, фрагмент 2 представлял собой центральный константный фрагмент, простирающийся от L3 до H3, а фрагмент 3 содержал рандомизированный H3 и 3'-область гена антитела.

Для создания входящих в библиотеку фрагментов для DP47-3-библиотеки применяли следующие комбинации праймеров: фрагмент 1 (LMB3-LibL1b_new), фрагмент 2 (MS63 - MS64), фрагмент 3 (Lib2H-fdseqlong) (см. табл. 3). Для создания входящих в библиотеку фрагментов для DP88-3-библиотеки применяли следующие комбинации праймеров: фрагмент 1 (LMB3-RJH_LIB3), фрагмент 2 (RJH31-RJH32) и фрагмент 3 (LIB88_2 - fdseqlong) (см. табл. 4).

Таблица 3

Праймеры, применявшиеся для создания DP47-3-библиотеки		SEQ ID NO
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
LibL1b_new	CACTTTGGTCCCCTGGCCGAACGTMNNGGGMNNMNMNNAACC CTGCTGACAGTAATACACTGC	333
MS63	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC	334
MS64	ACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGTGG	335
Lib2H	GGCCGTATATTACTGTGCGAAANNKNNKNNKNNKNTTTGAC TACTGGGGCCAAGGAAC	336
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTCTGTATGAGG	337

Таблица 4

Праймеры, применявшиеся для создания DP88-3-библиотеки		SEQ ID NO
Праймеры, применявшиеся для создания DP88-3-библиотеки		SEQ ID NO
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
RJH_LIB3	GACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGT MNN GGG MNN MNN ACC MNN CTGCAAGCAGTAATAGGTGGCAAAATC	338
RJH31	ACGTTTGGCCAGGGCACCAAGTCGAG	339
RJH32	TCTCGCACAGTAATACACGGCGGTGTCC	340
LIB88_2	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA –[(33% GAC Asp; 26% GGT Gly; 10% GAA Glu; 9% CGT Arg; 7% Lys; 6% GTT Val; 5% TCT Ser; 4% CTG Leu)1 - (23% GGT Gly; 17% TAC Tyr; 16% TCT Ser; 11% GCT Ala; 9% CGT Arg; 7% AAC Asn; 6% ACT Thr; 6% GTT Val; 5% CCG Pro)8]– TTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC	341
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG	337

Протокол ПЦР для получения входящих в библиотеки фрагментов включал: начальную денатурацию в течение 5 мин при 94°C; 25 циклов по 1 мин при 94°C, 1 мин при 58°C и 1 мин при 72°C и конечное удлинение в течение 10 мин при 72°C. Для ПЦР-сборки в качестве матрицы использовали эквимольные соотношения трех фрагментов. Протокол ПЦР-сборки включал начальную денатурацию в течение 3 мин при 94°C и 5 циклов по 30 с при 94°C, 1 мин при 58°C и 2 мин при 72°C. На этой стадии добавляли праймеры, комплементарные последовательности, расположенной вне фрагментов 1-3, и осуществляли дополнительные 20 циклов перед конечным удлинением в течение 10 мин при 72°C.

После сборки с получением достаточных количеств полноразмерных рандомизированных Fab-конструкций Fab-конструкции расщепляли с помощью NcoI/NotI в случае DP47-3-библиотеки и с помощью NcoI/NheI в случае DP88-3-библиотеки наряду с обработанным аналогичным образом акцепторным фагмидным вектором. В случае DP47-3-библиотеки 22,8 мкг Fab-библиотеки лигировали с 16,2 мкг фагмидного вектора. В случае DP88-3-библиотеки 30,6 мкг Fab-библиотеки лигировали с 30,6 мкг фагмидного вектора.

Очищенные полученные в результате лигирования смеси использовали для осуществления 68 трансформаций с использованием DP47-3-библиотеки и 64 трансформаций с использованием DP88-3-библиотеки соответственно с получением конечных размеров библиотек $4,2 \times 10^{10}$ DP47-3 и $3,3 \times 10^9$ DP88-3.

Фагмидные частицы, презентующие Fab-библиотеки, высвобождали ("спасали") и очищали с помощью ПЭГ/NaCl для применения для селекций.

Пример 3. Селекция клонов антител к FAP (первичные селекций)

Селекции осуществляли в отношении эктодомена человеческого или мышиноного белка активации фибробластов (FAP), которые клонировали против хода транскрипции относительно полилизиновой и 6×his-метки (см. SEQ ID NO: 317 и 319). Перед осуществлением селекций антигенами сенсibilizировали пробирки для иммуноанализов (иммунопробирки) в концентрации либо 10, либо 5 мкг/мл в зависимости от цикла селекций. Селекции осуществляли согласно следующему протоколу: (I) связывание ~ 10 фагмидных частиц библиотеки DP47-3 с иммобилизованным человеческим или мышинным FAP в течение 2 ч; (II) отмывка иммунопробирок с использованием 5×5 мл 3ФР/Твин 20 и 5×5 мл 3ФР; (III) элюция фаговых частиц путем добавления 1 мл 100мМ ТЭА (триэтиламин) в течение 10 мин и нейтрализация путем добавления 500 мкл 1М Трис/HCl, pH 7,4; и (IV) повторное заражение находящихся на log-фазе роста клеток *is. coli* линии TG1, заражение фагом-хелпером VCSM13 и последующее осаждение с помощью ПЭГ/NaCl фагмидных частиц, применяемых в последующих циклах селекций.

Селекции осуществляли с применением трех или четырех циклов, используя понижающиеся концентрации, применения в качестве антигена человеческий FAP, и в некоторых случаях используя мышинный FAP в концентрации 5 мкг/мл в конечном цикле селекций. Специфические связывающие агенты определяли по наличию сигналов, в 5 раз превышающих фоновый сигнал, и идентифицировали с помощью ELISA. Планшеты Maxisorp фирмы NUNC сенсibilizировали 10 мкг/мл человеческого или мышиноного FAP с последующим добавлением содержащих Fab-фрагменты супернатантов бактерий и определяли специфическое связывание Fab-фрагментов посредством их Flag-меток, используя в качестве вторичного антитела антитело к Flag/HRP.

Позитивные по данным ELISA клоны экспрессировали в бактериях в виде 1-миллилитровых культур в 96-луночном формате и супернатанты подвергали скринингу в отношении кинетических характеристик с использованием устройства BIACORE T100.

Величины K_D оценивали с помощью резонанса поверхностного плазмона, используя устройство BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare), при 25°C с применением специфического в отношении человеческого F(ab')₂-фрагмента "захватывающего" антитела (фирма Jackson ImmunoResearch, №109-005-006), иммобилизованного путем аминного сочетания на CM5-чипах, и с последующим "захватом" Fab-фрагментов из бактериального супернатанта или из препаратов очищенных Fab-фрагментов. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Спе-

цифическое в отношении человеческого F(ab')₂-фрагмента "захватывающее" антитело разводили 10 мМ ацетатом натрия, pH 5,0 до концентрации 50 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин до получения примерно вплоть до 10000 единиц ответа (RU) сшитого "захватывающего" антитела. После инъекции "захватывающего" антитела инъецировали 1М этаноламин для того, чтобы блокировать непрореагировавшие группы. Для кинетических измерений Fab-фрагменты из бактериального супернатанта или очищенные Fab-фрагменты инъецировали со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 300 с и осуществляли диссоциацию в течение 300 с для стабилизации фонового "захвата". Уровни "захвата" находились в пределах 100-500 RU. На следующей стадии человеческий или мышиный FAP, представляющий собой анализируемую субстанцию, разведенный в HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4), инъецировали либо в одной концентрации, либо в виде серий концентраций (в зависимости от аффинности клона в диапазоне от 100 нМ до 250 пМ) при 25°C со скоростью потока 50 мкл/мин. Продолжительность реакции ассоциации составляла 120 или 180 с, продолжительность реакции диссоциации составляла 300-600 с. Поверхность сенсорного чипа регенерировали путем инъекции глицина, pH 1,5 в течение 30 с при скорости потока 90 мкл/мин и последующей инъекцией NaOH в течение 20 с такой же скоростью потока. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и скорость реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывали с помощью простой (1:1) модели связывания Лэнгмюра (программа BIACORE® T100 Evaluation или программа Scrubber (фирма BioLogic)) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия скорости диссоциации (K_D) рассчитывали в виде соотношения k_{off}/k_{on} .

Пример 4. Конструирование библиотеки для созревания аффинности антител к FAP

Конструировали три библиотеки для созревания аффинности на основе предварительно отобранных антител, полученных при первичных селекциях антител к FAP. Более конкретно их создавали на основе (I) клона 2D9 антитела к FAP (библиотека a.m.FAP2D9) (см. SEQ ID NO: 229 и 231), (II) клона 4B8 антитела к FAP (библиотека a.m.FAP4B8) (см. SEQ ID NO: 233 и 235) и (III) обладающих перекрестной реактивностью клонов 7A1, 13B2, 13C2, 13E8, 14C10 и 17A11 (библиотека a.m.FAPpool) (см. SEQ ID NO: 237 и 239, соответствующие последовательностям переменных областей клона 7A1; SEQ ID NO: 241 и 243, соответствующие последовательностям переменных областей клона 13C2; SEQ ID NO: 245 и 247, соответствующие последовательностям переменных областей клона 13E8; SEQ ID NO: 249 и 251, соответствующие последовательностям переменных областей клона 14C10; и SEQ ID NO: 253 и 255, соответствующие последовательностям переменных областей клона 17A11).

Каждая из указанных библиотек состояла из двух подбиблиотек, в которых были рандомизированы либо CDR1 и CDR2 легкой цепи (L1/L2), либо CDR1 и CDR2 тяжелой цепи (H1/H2) соответственно. Указанные подбиблиотеки объединяли при осуществлении трансформации. Каждую из указанных подбиблиотек конструировали с помощью четырех последующих стадий амплификации и сборки.

Для L1/b2-библиотеки протокол амплификации и сборки включал: (I) амплификацию фрагмента 1 (LMB3-DPK22_CDR1_rand_ba_opt) и фрагмента 2 (DPK22_CDR1_fo - DPK22_Ck_BsiWI_ba); (II) сборку фрагментов 1 и 2 с помощью внешних праймеров LMB3 и DPK22_Ck_BsiWI_ba для создания матрицы для фрагмента 3; (III) амплификацию фрагмента 3 (LMB3-DPK22_CDR2_rand_ba) и фрагмента 4 (DPK22_CDR2_fo-DPK22_Ck_BsiWI_ba); и (IV) конечную сборку фрагментов 3 и 4 с помощью тех же внешних праймеров, которые указаны выше (см. в табл. 5 последовательности праймеров).

Таблица 5

Праймеры, применяемые в L1/L2-библиотеках для созревания аффинности при создании антител к FAP с созревшей аффинностью		SEQ ID NO
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
DPK22_CDR1_rand_ba_opt	CAGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAA G TAGCTGCTGCTAACACTCTGACTGGCCCTGCAAG	342
DPK22_CDR1_fo	TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG	343
DPK22_Ck_BsiWI_ba	GGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTC	344
DPK22_CDR2_rand_ba	CTGTCTGGGATGCCAGTGGCCCTGCT G GAGGCGCCATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTG	345
DPK22_CDR2_fo	AGGGCCACTGGCATCCCAGACAG	346

Жирный шрифт: 60% оснований представляют собой исходные основания, а 40% оснований рандомизированы в виде смеси M

Подчеркнуты: 60% оснований представляют собой исходные основания, а 40% оснований рандомизированы в виде смеси N

Для H1/H2-библиотек протокол амплификации и сборки включал: (I) амплификацию фрагмента 1 (RJH53 - DP47_CDR1_rand_ba_opt) и фрагмента 2 (DP47_CDR1_fo - MS52); (II) сборку фрагментов 1 и 2 с помощью внешних праймеров RJH53 и MS52 для создания матрицы для фрагмента 3; (III) амплификацию фрагмента 3 (RJH53 - DP47_CDR2_rand_ba) и фрагмента 4 (DP47_CDR2_fo - MS52); и (IV) конечную сборку фрагментов 3 и 4 с помощью тех же внешних праймеров, которые указаны выше (см. в табл. 6 последовательности праймеров).

Таблица 6

Праймеры, применяемые в H1/H2-библиотеках для созревания аффинности при создании антител к FAP с созревшей аффинностью	SEQ ID NO
RJH53	CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC
DP47_CDR1_rand_ba_opt	GAGCCTGGCGGACCCAGCTCATGGCATAACTGCT AAAGGTGAATCCGGAGGC
DP47_CDR1_fo	ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTC
MS52	GAAGACCGATGGGCCTTTGGTGCTAG
DP47_CDR2_rand_ba	CCTTCACGGAGTCTGCGTAGTATGTGCTACCACC ACTACCCTAATAAGCTGAGACCCACTCCAGCCCC TTCCC
DP47_CDR2_fo	ACATACCTACGCAGACTCCGTGAAGG

Жирный шрифт: 60% оснований представляют собой исходные основания, а 40% оснований рандомизированы в виде смеси М

Подчеркнуты: 60% оснований представляют собой исходные основания, а 40% оснований рандомизированы в виде смеси N

Продукты, полученные после конечной сборки, расщепляли с помощью NcoI/ BsiWI в случае L1/b2-подбиблиотек a.m.FAP2D9 и a.m.FAP4B8, с помощью MniI и NheI в случае H1/H2-подбиблиотек a.m.FAP2D9 и a.m.FAP4B8, а также с помощью NcoI/BamHI в случае L1/b2-библиотеки a.m.FAPpool и с помощью BspEI/PstI в случае H1/H2-библиотек a.m.FAPpool соответственно, наряду с обработанными аналогичным образом акцепторными векторами, основой которых являлись препараты плазмид, содержащих клоны 2D9, 4B8 или эквимоллярную смесь клонов 7A1, 13B2, 13C2, 13E8, 14C10 и 17A11 соответственно. В каждом случае лигировали взятые в указанных ниже количествах расщепленные рандомизированные (частично) V-области и расщепленный(ые) акцепторный(ые) вектор(ы) для соответствующих библиотек (мкг V-области/мкг вектора): a.m.FAP2D9 L1/b2-подбиблиотека (5,7/21,5), a.m.FAP2D9 H1/H2-подбиблиотека (4,1/15,5), a.m.FAP4B8 L1/b2-подбиблиотека (6,5/24,5), a.m.FAP4B8 H1/H2-подбиблиотека (5,7/21,5), a.m.FAPpool L1/L2-подбиблиотека (4,4/20), a.m.FAPpool H1/H2-подбиблиотека (3,4/15,5).

Очищенные полученные в результате лигирования подбиблиотеки L1/L2 и H1/H2 объединяли и применяли для 60 трансформаций с использованием каждой из трех библиотек для созревания аффинности, получая следующие конечные 9,9 размеры библиотек: $6,2 \times 10^9$ в случае a.m.FAP2D9, $9,9 \times 10^9$ в случае a.m.FAP4B8 и $2,2 \times 10^9$ в случае a.m.FAPpool.

Фагмидные частицы, презентирющие эти Fab-библиотеки, высвобождали ("спасали") и очищали с помощью ПЭГ/NaCl для применения для вторичных селекций.

Конструирование дополнительных библиотек для созревания аффинности антител к FAP (на основе клонов 3F2, 3D9, 4G8, 4B3 и 2C6)

Создавали 4 дополнительные библиотеки для созревания аффинности на основе предварительно отобранных обладающих перекрестной реактивностью антител из первой группы антител к FAP с созревшей аффинностью, а именно клонов 3F2, 3D9, 4G8, 4B3 и 2C6 (см. SEQ ID NO: 195 и 197, которые соответствуют последовательностям переменных областей клона 3F2; SEQ ID NO: 199 и 201, которые соответствуют последовательностям переменных областей клона 3D9; SEQ ID NO: 205 и 207, которые соответствуют последовательностям переменных областей клона 4G8; SEQ ID NO: 209 и 211, которые соответствуют последовательностям переменных областей клона 4B3; SEQ ID NO: 217 и 219, которые соответствуют последовательностям переменных областей клона 2C6). Более конкретно основой четырех библиотек являлись 1) клоны антител к FAP 3F2, 4G8 и 4B3 (V_H -библиотека с рандомизированными CDR 1 и 2 переменной области тяжелой цепи, т.е. H1/H2-библиотека), 2) клоны антител к FAP 3D9 и 2C6 (V_L -библиотека с рандомизированными CDR 1 и 2 переменной области легкой цепи, т.е. L1/L2-библиотека), 3) клон антитела к FAP 3F2 (L3-библиотека со слабой рандомизацией CDR3 легкой цепи, т.е. L3-библиотека) и 4) клон антитела к FAP 3F2 (H3-библиотека со слабой рандомизацией CDR3 тяжелой цепи, т.е. H3-библиотека). Первые две библиотеки конструировали точно в соответствии с методом, изложенным для первой группы антител к FAP с созревшей аффинностью, т.е. для L1/L2- и H1/H2-библиотек соответственно. В отличие от этого для L3- и H3-библиотек с созревшей аффинностью на основе клона 3F2 применяли два новых праймера для интродукции слабой рандомизации в L3 (AM_3F2_DPK22_L3_ba: CACTTTGGTCCCCTGGCCGAACGTCGGGGGAAGCATAATACCCTGCTGACAGTAATACACTGC. где из подчеркнутых оснований 60% представляют собой исходные основания, а 40% - смесь N (смесь четырех нуклеотидов A, C, G и T)) и H3 (AM_3F2_DP47_H3_fo: GGCCGTATATTAAGTGTGCGAAAGGGTGGTTTGGTGGTTTAACTACTGGGGCCAAGGAAC, где из подчеркнутых оснований 60% представляют собой исходные основания, а 40% оснований представляют собой смесь N, из выделенных курсивом оснований 60% представляют собой исходные основания, а 40% оснований представляют собой G, а также из подчеркнутых оснований, выделенных курсивом, 60% оснований представляют собой указанные основания, а 40% оснований представляют собой смесь K (смесь двух нуклеотидов G и T)) родительского клона. Библиотеки имели следующие размеры: H1/H2-библиотека ($1,13 \times 10^{10}$), L1/L2-библиотека ($5,6 \times 10^9$), L3-библиотека ($2,3 \times 10^{10}$) и H3-библиотека ($2,64 \times 10^{10}$).

Пример 5.

Селекция клонов антител к FAP с созревшей аффинностью. Селекции осуществляли в отношении эктодомена человеческого или мышинного белка активации фибробластов (FAP), который клонировали против хода транскрипции относительно полилизиновой и 6×his-метки (см. SEQ ID NO: 317 и 319). Перед осуществлением селекций антигенами сенсибилизировали иммунопробирки в концентрации либо 10, либо 5, либо 2 мкг/мл в зависимости от библиотеки и цикла селекций. Селекции осуществляли согласно следующему протоколу: (I) связывание $\sim 10^{12}$ фагмидных частиц библиотеки a.m.FAP2D9, a.m.FAP4B8 или a.m.FAPpool с иммобилизованным человеческим или мышинным FAP в течение 2 ч; (II) отмывка иммунопробирок с использованием 10-20×5 мл 3ФР/Твин 20 и 10-20×5 мл 3ФР (в зависимости от библиотеки и цикла селекций); (III) элюция фаговых частиц путем добавления 1 мл 100 мМ ТЭА (триэтиламин) в течение 10 мин и нейтрализация путем добавления 500 мкл 1М Трис/HCl, pH 7,4; и (IV) повторное заражение находящихся на log-фазе клеток E. coli линии TG1, заражение фагом-хелпером VCSM13 и последующее осаждение с помощью ПЭГ/NaCl фагмидных частиц, применяемых в последующих циклах селекций.

Селекции осуществляли с применением двух циклов и условия регулировали для каждой из трех библиотек индивидуально. Более детально, параметры селекций были следующими: a.m.FAP2D9 (5 мкг/мл человеческого FAP и 20 отмывок в целом для цикла 1, 1 мкг/мл человеческого FAP и 30 отмывок в целом для цикла 2), a.m.FAP4B8 (1 мкг/мл мышинного FAP и 30 отмывок в целом для цикла 1, 0,2 мкг/мл человеческого FAP и 40 отмывок в целом для цикла 2) и a.m.FAPpool (5 мкг/мл человеческого FAP и 30 отмывок в целом для цикла 1, 5 мкг/мл мышинного FAP и 30 отмывок в целом для цикла 2). Специфические связывающие агенты определяли по наличию сигналов, в 5 раз превышающих фоновый сигнал, и идентифицировали с помощью ELISA. Планшеты Maxisorp фирмы NUNC сенсибилизировали 1 мкг/мл или 0,2 мкг/мл человеческого или мышинного FAP с последующим добавлением содержащих Fab-фрагменты супернатантов бактерий и определяли специфическое связывание Fab-фрагментов посредством их Flag-меток, используя в качестве вторичного антитела антитело к Flag/HRP.

Позитивные по данным ELISA клоны экспрессировали в бактериях в виде 1-миллилитровых культур в 96-луночном формате и супернатанты подвергали скринингу в отношении кинетических характеристик с использованием устройства BIACORE T100 согласно описанному выше методу (см. пример 3).

Дополнительная селекция клонов антител к FAP с созревшей аффинностью

Селекции осуществляли в отношении эктодомена человеческого или мышинного белка активации фибробластов (FAP), который клонировали против хода транскрипции относительно 6×лизиновой и 6×his-метки (см. SEQ ID NO: 317 и 319). Перед осуществлением селекций антигенами сенсибилизировали иммунопробирки в концентрации либо 1, либо 0,2, либо 0,02 мкг/мл в зависимости от библиотеки и цикла селекций. Селекции и основанный на применении ELISA скрининг осуществляли согласно методу, описанному для первой группы антител к FAP с созревшей аффинностью. Вторичный скрининг осуществляли с использованием биосенсора ProteOn XPR36 (фирма Biorad) и константы скорости реакции и аффинность определяли, анализируя препараты Fab с созревшей аффинностью с использованием этого же инструмента. Величины K_D оценивали с помощью резонанса поверхностного плазмона, используя устройство ProteOn XPR36 (фирма Biorad), при 25°C с применением специфического в отношении человеческого F(ab')₂-фрагмента "захватывающего" антитела (фирма Jackson ImmunoResearch, №109-005-006), иммобилизованного на GLM-чипах, и с последующим "захватом" Fab-фрагментов из бактериального супернатанта или из препаратов очищенных Fab-фрагментов. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные GLM-чипы (фирма Biorad) активировали в течение 5 мин с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS). Специфическое в отношении человеческого F(ab')₂-фрагмента "захватывающее" антитело разводили с помощью 10мМ ацетата натрия, pH 5,0 до концентрации 24 мкг/мл перед инъекцией в течение 5 мин до получения примерно вплоть до 10000 единиц ответа (RU) сшитого "захватывающего" антитела. После инъекции "захватывающего" антитела инъецировали 1М этаноламин для того, чтобы блокировать непрореагировавшие группы. Для кинетических измерений Fab-фрагменты из бактериального супернатанта инъецировали со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 100 с. Уровни "захвата" находились в пределах 250 RU. На следующей стадии инъецировали серийные разведения человеческого, мышинного FAP или FAP обезьян циномолгус в качестве анализируемого вещества (двукратное разведение, наиболее высокая концентрация 25нМ), разведенные в 3ФР/0,005% Твин-20, при 25°C со скоростью потока 50 мкл/мин. Продолжительность реакции ассоциации составляла 240 с, продолжительность реакции диссоциации составляла 600-1800 с. Поверхность сенсорного чипа регенерировали путем инъекции 0,85% H₃PO₄ в течение 30 с со скоростью потока 100 мкл/мин с последующей инъекцией 50мМ NaOH в течение 30 с такой же скоростью потока. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и скорость реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывали с помощью простой (1:1) модели связывания Лэнгмюра (программа ProteOn manager, версия 2.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия скорости диссоциации (K_D) рассчитывали в виде соотношения k_{off}/k_{on} .

Идентифицировали следующее клоны с созревшей аффинностью: 19G1 (см. SEQ ID NO: 257 и 259),

20G8 (см. SEQ ID NO: 281 и 263), 4B9 (см. SEQ ID NO: 265 и 267), 5B8 (см. SEQ ID NO: 269 и 271), 5F1 (см. SEQ ID NO: 273 и 275), 14B3 (см. SEQ ID NO: 277 и 279), 16F1 (см. SEQ ID NO: 281 и 283), 16F8 (см. SEQ ID NO: 285 и 287), O3C9 (см. SEQ ID NO: 289 и 291), 22A3 (см. SEQ ID NO: 301 и 303) и 29B11 (см. SEQ ID NO: 305 и 307) (все эти клоны отбирали из H1/H2-библиотеки и получали из родительского клона 3F2), O2D7 (см. SEQ ID NO: 293 и 295) (отобран из L3-библиотеки, основой которой является родительский клон 3F2) и 28H1 (см. SEQ ID NO: 297 и 299) и 23C10 (см. SEQ ID NO: 309 и 311 из табл. 3) (эти два клона отбирали из H1/H2-библиотеки и получали из родительского клона 4G8).

На фиг. 1-5 представлены сенсограммы, полученные методом резонанса поверхностного плазмона, для отобранных Fab-фрагментов с созревшей аффинностью, которые связываются с иммобилизованным FAP, а в таблице 7 представлены соответствующие значения аффинности. Отобранные Fab характеризовались аффинностью в широком диапазоне от пикомолярных до наномолярных значений и обладали перекрестной реактивностью к человеческому (hu) и мышинному (mu) FAP, а также FAP обезьяны циномолгус (супо), по данным, полученным для отобранных клонов. Для анализа специфичности Fab-фрагменты с созревшей аффинностью, связывающиеся с FAP, превращали в формат Fab-IL2-Fab и в антитела типа IgG. Наличие специфичности связывания подтверждали по отсутствию связывания с белком DPPIV, близким гомологом FAP, при его экспрессии на НЕК293- или CHO-клетках (см. пример 9).

Таблица 7. Обобщение данных о кинетических константах равновесия реакций (K_D) антител к FAP с созревшей аффинностью в виде Fab-фрагментов (одновалентное связывание)

Антитело	Аффинность (K_D) к hu FAP [пМ]	Аффинность (K_D) к mu FAP [пМ]	Аффинность (K_D) к супо FAP [пМ]
19G1	76	2600	n.d.
20G8	69	2800	n.d.
4B9	157	3300	n.d.
5B8	690	3200	n.d.
5F1	243	4100	n.d.
14B3	377	3800	n.d.
16F1	193	3400	n.d.
16F8	301	3800	n.d.
O3C9	160	3700	n.d.
O2D7	619	8300	n.d.
28H1	200	9	3600
22A3	34	655	522
29B11	35	436	23
23C10	1600	125	990

Пример 6. Конверсия в формат IgG Fab-фрагментов, связывающихся с FAP

Родительские Fab-фрагменты 3F2, 4G8 и 3D9 и производные Fab с созревшей аффинностью 3F2 и 4G8 превращали в формат человеческого IgG1, формат мышинного IgG2a и формат человеческого IgG1.

Последовательности ДНК тяжелых и легких цепей полноразмерных антител получали либо путем субклонирования варибельных областей в рамке считывания с соответствующей константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи, которые предварительно встраивали в различные экспрессионные векторы-реципиенты млекопитающих, либо рекомбинантно путем слияния короткого сегмента последовательности, гомологичного сайту встраивания векторов-реципиентов. Рекомбинацию осуществляли согласно руководству "In-Fusion Cloning System" фирмы Invitrogen.

Во всех векторах экспрессия антитела находилась под контролем промотора MPSV, и все векторы несли синтетическую сигнальную последовательность поли-А-хвоста на 3'-конце CDS. Кроме того, каждый вектор содержал OriP-последовательность EBV.

Пример 7. Вiascore-анализ антител к FAP типа IgG

Далее определяли и сравнивали аффинность связывающихся с FAP Fab-фрагментов 3F2, 4G8 и 3D9, а также антител к FAP, полученных в результате конверсии в человеческий IgG, в отношении FAP человека, мышей и обезьян циномолгус с помощью анализа на основе резонанса поверхностного плазмона, (SPR), который осуществляли при 25°C с использованием устройства BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare). Для этой цели внеклеточный домен FAP человека, мышей или обезьян циномолгус (SEQ ID NO: 317-322) "захватывали" с помощью иммобилизованного антитела к His (Penta His, фирма Qiagen, № 34660), а антитела использовали в качестве анализируемого вещества. Для иммобилизации биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антитело Penta His разводили 10 мМ ацетатом натрия, pH 5,0 до концентрации 40 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин до получения примерно вплоть до 9000 единиц ответа (RU) сшитого белка. После инъекции лиганда инъецировали 1М этанол-амин для того, чтобы блокировать непрореагировавшие группы.

Для кинетических измерений внеклеточный домен FAP человека, мышей или обезьян циномолгус инъецировали со скоростью 10 мкл/мин в концентрации 10 нМ в течение 20 с (в случае Fab-фрагментов)

или 20 нМ в течение 25 с (в случае IgG) и "захватывали" через их His-метку с помощью иммобилизованного антитела Penta His. Серийные разведения антитела (двукратные разведения от 6,25 до 200 нМ в случае Fab-фрагментов или пятикратные разведения от 3,2 пМ до 10 нМ в случае IgG) инъецировали в HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока 90 мкл/мин. Использовали следующие параметры: продолжительность реакции ассоциации 180 с, диссоциации - 300 с (в случае Fab) или 900 с (в случае IgG), регенерация 10мМ глицином, pH 2 в течение 60 с между каждым циклом. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и скорость реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывали с помощью простой (1:1) модели связывания Лэнгмюра (программа BIACORE® T100, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации (модельные параметры включали локальное значение R_{max} и $RI=0$). Константу равновесия скорости диссоциации (K_D) рассчитывали как соотношение k_{off}/k_{on} .

Характеризующие связывание значения K_D представлены в табл. 8. На фиг. 6А-В представлены соответствующие результаты анализов кинетических характеристик, полученные с помощью SPR, для Fab-фрагментов, на фиг. 7А-В для антител типа IgG.

Таблица 8. Обобщение данных о кинетических константах равновесия реакций (K_D) антител к FAP 3F2, 4G8 и 3D9 в виде Fab-фрагментов и в виде IgG

Конструкция	Человеческий FAP	Мышиный FAP	Суно FAP
IgG 3F2	Авидность: 39 пМ	Авидность: 29 пМ	Авидность: 42 пМ
IgG 4G8	Авидность: 51 пМ	Авидность: 1 пМ	Авидность: 59 пМ
IgG 3D9	Авидность: 93 пМ	Авидность: 96 пМ	Авидность: 96 пМ
Fab-фрагмент 3F2	Аффинность: 13 нМ	Аффинность: 14 нМ	Аффинность: 11 нМ
Fab-фрагмент 4G8	Аффинность: 74 нМ	Аффинность: 7 нМ или менее	Аффинность: 56 нМ
Fab-фрагмент 3D9	Аффинность: 133 пМ	Аффинность: 32 нМ	Аффинность: 143 нМ

Пример 8. Связывание антител к FAP 3F2, 4G8 и 3D9, изученное на срезах тканей человеческих опухолей

Осуществляли эксперименты по выявлению и сравнению экспрессии FAP в свежемороженых тканях человеческих опухолей (ткани рака молочной железы, аденокарциномы ободочной кишки и NSCLC) с использованием антител клонов 3F2, 4G8 и 3D9 в виде мышиного IgG2a.

Применяли один микромассив свежемороженых тканей (ТМА) (AST 274), в который входили образцы тридцати различных опухолей по два пятна для каждой, который получали из банка опухолей Roche TRS Pathology & Tissue Biomarkers. В ТМА входили 10 инвазивных карцином протоков молочной железы, 10 колоректальных карцином и 10 образцов немелкоклеточного рака легкого, полученных от фирмы Asterand Ltd, Ройстон, Великобритания.

Для иммуногистохимического окрашивания (ИГХ) использовали следующие антитела: моноклональное мышиное антитело к человеческому FAP, клон 3F2 (15,8 нг/мл, разведенное в разбавителе для антител фирмы Ventana), моноклональное мышиное антитело к человеческому FAP, клон 4G8 (1000 нг/мл, разведенное в разбавителе для антител фирмы Ventana) и моноклональное мышиное антитело к человеческому FAP, клон 3D9 (1000 нг/мл, разведенное в разбавителе для антител фирмы Ventana). Поликлональный мышиный IgG2a, концентрация 100 мкг/мл (поставщик: фирма DAKO, X0943, лот № 00058066) применяли для контроля изотипа.

Окрашивание осуществляли согласно стандартным протоколам на устройстве Ventana Benchmark XT, используя набор для обнаружения Ventana Ultra-View с HRP-системой для обнаружения (содержащей универсальный мультиметр HRP (Universal HRP Multimer) и DAB для окрашивания). Контрастное окрашивание осуществляли с помощью гематоксилина II (фирма Ventana, гематоксин Майера) и реагента Blueing (фирма Ventana) в течение 8 мин.

ТМА анализировали полуколичественно и оценивали общий уровень экспрессии FAP (интенсивность окрашивания), а также локализацию экспрессии FAP в опухолевой ткани.

При применении всех трех антител к FAP во всех образцах опухолевых тканей (рак молочной железы, колоректальный рак и рак легкого), которые можно было оценивать, обнаружена интенсивность сигнала окрашивания FAP от средней до высокой в стромальном компоненте опухоли. Удалось оценить с помощью антител по меньшей мере 7 из 10 образцов каждой опухоли. Остальные образцы не удалось оценить, поскольку центральная масса ткани включала складчатые артефакты, включающие только здоровую ткань, или отсутствовала.

Как и ожидалось, сигнал FAP по-разному локализовался в стромальном компоненте опухолей. Обнаружено небольшое различие в интенсивности сигнала между клоном 3F2 и клонами 3D9 и 4G8. Несколько более сильный сигнал обнаружен при применении клонов 3D9 и 4G8, однако различие было очень небольшим.

На фиг. 8А-Г представлены репрезентативные микрофотографии образцов тканей человеческих опухолей, которые иммуногистохимически окрашивали в отношении FAP с использованием мышиных

антител к FAP типа IgG2a клонов 3F2, 3D9 или 4G8 или применяемого в качестве контроля изотипа антитела.

Пример 9. Связывание антител к FAP с FAP на клетках

Связывание человеческих антител типа IgG1 клонов 3F2, 4B3 и 4G8 с человеческим и мышиным FAP, экспрессируемым на стабильно трансфектированных клетках HEK293, измеряли с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 150000 клеток на лунку инкубировали с взятыми в указанных концентрациях антителами к FAP 3F2, 4B3 и 4G8 в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и отмывали однократно 3ФР/0,1% БСА. Связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего античеловеческого антитела AffiniPure, F(ab')₂-специфического (фирма Jackson Immuno Research Lab, №109-096-097, используя следующий рабочий раствор: разведенная в соотношении 1:20 смесь 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленная) после инкубации в течение 30 мин при 4°C, применяя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Результаты представлены на фиг. 9. Определяли значения EC₅₀ при связывании, составляющем половину от максимального, которые характеризовали связывание с человеческим или мышиным FAP, и они представлены в табл. 9.

Таблица 9. Связывание антител к FAP с FAP на клетках (значения EC₅₀)

	Значения EC ₅₀ на клетках [нМ]	
	Человеческий FAP	Мышиный FAP
3F2 IgG	4,8	1,0
4B3 IgG	5,5	1,6
4G8 IgG	5,0	1,7

Специфичность антител к FAP

Для оценки специфичности связывания полученных на основе фагового дисплея антител связывание с клетками HEK293, стабильно экспрессирующими DPPIV (близкий гомолог FAP, который экспрессируется в здоровых тканях) или HER2, оценивали для антител к FAP типа человеческого IgG1 клонов 3F2, 4B3 и 4G8. В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку (HEK293-DPPIV или в качестве контроля HEK293-HER2) инкубировали с 30 мкг/мл антител к FAP 3F2, 4B3 или 4G8 в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и отмывали однократно 3ФР/0,1% БСА. В качестве положительных контролей использовали трастузумаб (антитело к HER2) или конъюгированное с фикоэритрином (ФЭ) мышиное античеловеческое антитело к CD26/DPPIV (CD26 = DPPIV, мышиный IgG1, к, фирма BD Biosciences, № 555437, клон М-А261). Связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с ФЭ F(ab')₂-фрагмента козьего античеловеческого антитела AffiniPure типа IgG, Fcy-специфического (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-116-170, используя следующий рабочий раствор: разведенная в соотношении 1:20 смесь 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленная) после инкубации в течение 30 мин при 4°C, применяя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 10. Ни у одного из антител к FAP не выявлено выраженное связывание с DPPIV или HER2, их сигналы находились в диапазоне, соответствующем отрицательным контролям (только вторичное антитело, применяемое в качестве контроля изотипа антитела или вариант без антитела).

Связывание антител к FAP с FAP на человеческих фибробластах

Связывание человеческих антител типа IgG1 с человеческим FAP, экспрессируемым на линии клеток человеческих фибробластов GM05389 (получена из легкого человеческого плода, National Institute of General Medical Sciences, Камден, шт. Нью-Джерси), оценивали с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку инкубировали с 30 мкг/мл антител к FAP 3F2 или 4G8 в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и однократно отмывали 3ФР/0,1% БСА. Связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего античеловеческого антитела AffiniPure типа IgG, Fcy-специфического (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-098, используя следующий рабочий раствор: разведенная в соотношении 1:20 смесь 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленная) после инкубации в течение 30 мин при 4°C, применяя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 11. Оба антитела к FAP сильно связывались с FAP, экспрессируемым на человеческих фибробластах.

Связывание антител к FAP с FAP на человеческих опухолевых клетках

Связывание человеческих антител типа IgG1 с человеческим FAP, экспрессируемым на линии клеток человеческих фибробластов GM05389 и на стабильно трансфектированных клетках HEK293 сравнивали с экспрессией FAP на человеческих линиях раковых клеток ACHN, Colo205, MDA-MB231, MDA-MB435 и KPL4 с помощью FACS.

В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку инкубировали с 10 мкг/мл антител к FAP 3F2 или 4G8 в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и однократно отмывали 3ФР/0,1% БСА. Связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего античеловеческого антитела AffiniPure типа IgG, F(ab')₂-специфического (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-097, используя следующий рабочий раствор: разведенная в соотношении 1:20 смесь 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленная) после инкубации в течение 30 мин при 4°C,

применяя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 12. Данные свидетельствуют о том, что антитела 3F2 и 4G8 связываются специфически с FAP, для которого характерна выраженная сверхэкспрессия на фибробластах, и на стабильно трансфектированных клетках HEK293; однако лишь слабое связывание можно обнаружить при использовании линий человеческих опухолевых клеток ACHN, Colo205, MDA-MB231, MDA-MB435 и KPL4.

Пример 10. Анализ с помощью FACS интернализации FAP при связывании с антителом к FAP

Для нескольких известных в данной области антител к FAP описана способность индуцировать интернализацию FAP при связывании (например, описано у Baum и др., *J Drug Target* 15, 2007, сс. 399-406; Bauer и др., *Journal of Clinical Oncology*, 2010, труды ежегодной конференции ASCO (издание после конференции), т. 28 (приложение от 20 мая), реферат № 13062 (2010); Ostermann и др., *Clin Cancer Res* 14, 2008, сс. 4584-4592).

Поэтому при создании изобретения анализировали способность вызывать интернализацию антител, предлагаемых в изобретении. В целом, метод состоял в следующем: клетки линии GM05389 (фибробласты человеческого легкого), которые культивировали в среде EMEM + 15% FCS, отделяли, промывали, подсчитывали, оценивали жизнеспособность и высеивали с плотностью 0,2 млн клеток/лунку в 12-луночные планшеты. На следующий день антитела к FAP 4G8 и 3F2 (фиг. 13А) или только 4G8 (фиг. 13Б) разводили до концентрации 10 мкг/мл в холодной среде, клетки охлаждали на льду и добавляли соответственно разведенные антитела (0,5 мл/лунку) или только среду. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин в холодной комнате при осторожном встряхивании, после чего добавляли 0,5 мл теплой среды и дополнительно инкубировали клетки при 37°C в течение указанных периодов времени. Через различные промежутки времени клетки переносили на лед, отмывали однократно холодным ЗФР и инкубировали с 0,4 мл вторичного антитела (конъюгированный с Alexa Fluor 633 козий античеловеческий IgG, фирма Molecular Probes, № A-21091, 2 мг/мл, для применения разведение 1:500) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки отмывали дважды ЗФР/0,1% БСА, переносили в 96-луночный планшет, центрифугировали в течение 4 мин при 4°C, 400×g и клеточный дебрис ресуспендировали путем интенсивного перемешивания. Клетки фиксировали с помощью 100 мкл 2% ПФА (параформальдегид). Для оценки с помощью FACS клетки ресуспендировали в 200 мкл/образец ЗФР/0,1% БСА и количественно анализировали с помощью протокола для планшетов на устройстве FACS CantoII (программа FACS Diva). Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 13 А и Б, и они демонстрируют, что антитела к FAP 4G8 и 3F2 не индуцируют интернализацию FAP на фибробластах.

Анализ интернализации FAP при связывании с антителом к FAP путем иммунофлуоресценции

Клетки линии GM05389 (фибробласты человеческого легкого) выращивали на стеклянных покровных стеклах в среде EMEM + 15% FCS. Перед обработкой клетки отмывали трижды ЗФР и выращивали в минимальной среде EMEM + 0,1% БСА в течение 2 ч. Антитело к FAP (4G8 в виде IgG) или антитело к CD20 (GA101, применяемое в качестве контроля изотипа) разводили в холодной среде EMEM до конечной концентрации 10 мкг/мл. После выдерживания в минимальной среде клетки охлаждали на льду, дважды промывали холодным ЗФР и инкубировали с разведенными антителами (0,5 мл/лунку) в течение 45 мин при 4°C при постоянном перемешивании, позволяя связываться с поверхностью. Затем клетки отмывали дважды холодным ЗФР и либо фиксировали холодным ПФА (ТО, параформальдегид, 4% в ЗФР, pH 7,4), либо дополнительно инкубировали при 37°C в течение 20 мин, 1, 3 и 6 ч в среде EMEM + 10% FCS. В каждый указанный момент времени клетки отмывали дважды холодным ЗФР и фиксировали ПФА в течение 20 мин на льду. После фиксации клетки отмывали 4 раза холодным ЗФР, повышали проницаемость с помощью 0,03% тритона и инкубировали с антителом к EEA1 (маркер ранних эндосом) в течение 45 мин при комнатной температуре в блокирующем буфере (ЗФР + 10% FCS). Затем клетки отмывали трижды ЗФР и инкубировали с флуоресцентно меченными вторичными антителами (ослиное антимышье антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 594, и козье античеловеческое антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488) при комнатной температуре в течение еще 45 мин. Клетки окончательно промывали и приготавливали препараты на предметных стеклах, используя заливочную среду Immuno Mount.

На фиг. 14А-Г представлены репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения, демонстрирующие окрашивание FAP плазматических мембран на фибробластах легкого линии GM05389, полученные после связывания антитела к FAP 4G8 в виде IgG в течение 45 мин при 4°C (А), в течение 20 мин при 37°C (Б), в течение 1 ч при 37°C (В) или в течение 6 ч при 37°C (Г). Для антитела к CD20 GA101, которое применяли в качестве контроля изотипа, обнаружено фоновое окрашивание. EEA1 метит ранние эндосомы. Следует отметить сохранение окрашивания FAP поверхности плазматической мембраны вплоть до 6 ч после связывания с антителом к FAP 4G8.

Пример 11. Вiascore-анализ антител к FAP типа IgG с созревшей аффинностью

Антитела к FAP в виде Fab-фрагментов с созревшей аффинностью, выведенные из 3F2 и 4G8, конвертировали в кроличьи антитела в виде IgG. Затем оценивали аффинность к FAP конвертированных антител с созревшей аффинностью 3F2 и 4G8 кроличьих антител к FAP типа IgG1 и изучали для FAP человека, мышей и обезьян циномоглус с помощью SPR-анализа при 25°C (Вiascore-анализ). Для этой

цели внеклеточный домен FAP человека, мышей и обезьян циномолгус (SEQ ID NO: 317-322) "захватывали" с помощью иммобилизованного антитела к His (Penta His, фирма Qiagen, № 34660) и антитела применяли в качестве анализируемых субстанций. IgG разводили в соотношении 1:5, начиная с концентрации 10 нМ, до концентрации 3,2 пМ. Использовали следующие параметры: продолжительность реакции ассоциации 180 с, продолжительность реакции диссоциации 900 с, скорость потока 90 мкл/мин. Регенерация с помощью 10 мМ глицина, pH 2 в течение 60 с. Кривые аппроксимировали с помощью модели 1:1, получая значения K_D (локальное значение R_{max} , $RI=0$).

Пример 12. Связывание антител к FAP с созревшей аффинностью с FAP на клетках

Связывание человеческого антитела с созревшей аффинностью типа IgG1, такого как 28H1, меченого Alexa-647 (1,89 мг/мл, 1,83 моль красителя/моль белка), которое получали из родительского антитела 4G8, с человеческим FAP, экспрессируемым на стабильно трансфектированных клетках HEK293, оценивали количественно с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку инкубировали с взятыми в указанных концентрациях 2 и 10 мкг/мл родительским антителом 4G8 и антителом к FAP с созревшей аффинностью 28H1 в круглодонном 96-луночном планшете, инкубировали в течение 30 мин при 4°C и отмывали однократно 3ФР/0,1% БСА. Связанное антитело выявляли после инкубации в течение 30 мин при 4°C, используя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Полученные результаты демонстрируют, что для обоих антител характерно сильное связывание с клетками HEK293, трансфектированными человеческим FAP (фиг. 23).

Пример 13. Связывание антител к FAP с созревшей аффинностью с FAP на человеческих фибробластах

Связывание антител с созревшей аффинностью типа IgG1, выведенных из 3F2, с человеческим FAP, экспрессируемым на клеточной линии человеческих фибробластов GM05389 (получена из легкого человеческого плода, National Institute of General Medical Sciences, Камден, шт. Нью-Джерси), оценивали с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку инкубировали с 30 мкг/мл антитела к FAP с созревшей аффинностью 3F2 в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и однократно отмывали 3ФР/0,1% БСА. Связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с ФИТЦ F(ab')₂-фрагмента козьего античеловеческого антитела AffiniPure типа IgG, Fcγ-специфического (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-098, используя следующий рабочий раствор: разведенная в соотношении 1:20 смесь 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленная) после инкубации в течение 30 мин при 4°C, применяя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva). Определяли значения EC_{50} при связывании, составляющем половину от максимального, которые характеризовали связывание с человеческим и мышинным FAP.

Пример 14. Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность, связанная с созданными с помощью гликоинженерии антителами к FAP типа IgG1

Человеческие антитела к FAP типа IgG1, выведенные из 4G8 или 3F2, создавали путем гликоинженерии посредством котрансфекции плазмидами, кодирующими GnTIII и ManII, согласно методу, описанному в примере 1. Затем созданные с помощью гликоинженерии родительские антитела 4G8 и 3F2 и антитело с созревшей аффинностью 28H1 в виде человеческого IgG1 сравнивали с помощью ADCC-анализа в отношении их способности опосредовать повышенную антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность по сравнению с их не подвергнутыми гликоинженерии версиями дикого типа.

В целом, метод состоял в следующем: собирали в качестве клеток-мишеней HEK293-клетки, стабильно трансфектированные человеческим FAP, отмывали и ресуспендировали с культуральной среде, окрашивали свежеприготовленным кальцеином AM (фирма Molecular Probes) при 37°C в течение 30 мин, отмывали трижды, подсчитывали количество клеток и разводили до 300000 клеток/мл. Эту суспензию переносили в круглодонный 96-луночный планшет (=30000 клеток/мл), добавляли разведение соответствующего антитела и инкубировали в течение 10 мин для облегчения связывания тестируемого антитела с клетками до контакта с эффекторными клетками. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней составляло 25: 1 в случае PBMC. Совместную инкубацию осуществляли в течение 4 ч. В качестве выходных данных определяли высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в супернатанте после расщепления "атакуемых" клеток. LDH из супернатанта совместной культуры собирали и анализировали с помощью набора для выявления LDH (фирма Roche Applied Science). Превращение субстрата с помощью фермента LDH измеряли с использованием ридера абсорбции для ELISA (программа SoftMaxPro, длины референс-волн: 490 нм, 650 нм). Как продемонстрировано на фиг. 24 все тестируемые антитела к FAP обладали способностью индуцировать ADCC в отношении клеток HEK293-hFAP. Созданные с помощью гликоинженерии версии (ge) обладали всегда более выраженной активностью по сравнению с соответствующей не подвергнутой гликоинженерии версией дикого типа (wt).

Хотя выше изобретение описано достаточно подробно с помощью иллюстраций и примеров, приведенных для целей лучшего понимания, описание и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все процитированные в настоящем описании патентные и научные публикации полностью включены в него в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), где указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 267 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 265.
2. Антитело по п.1, где указанное антитело содержит Fc-область.
3. Антитело по п.2, где указанная Fc-область представляет собой Fc-область IgG.
4. Антитело по любому из пп.1-3, где указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело класса IgG.
5. Антитело по любому из пп.1-4, где указанное антитело содержит константную область человеческого антитела.
6. Антитело по любому из пп.1-5, где указанное антитело представляет собой человеческое антитело.
7. Антитело по любому из пп.1-6, где указанное антитело содержит созданную с помощью гликоинженерии Fc-область, причем указанное антитело имеет повышенное содержание нефукозилированных олигосахаридов в Fc-области по сравнению с антителом, созданным без применения гликоинженерии.
8. Антитело по п.7, в котором по меньшей мере от примерно 20 до примерно 100% N-связанных олигосахаридов в указанной Fc-области являются нефукозилированными.
9. Антитело по п.7 или 8, где указанное антитело имеет повышенное содержание олигосахаридов в указанной Fc-области, которые являются бисекционными благодаря N-ацетилглюкозамину (GlcNAc), по сравнению с антителом, созданным без применения гликоинженерии.
10. Антитело по п.9, в котором по меньшей мере от примерно 20 до примерно 100% N-связанных олигосахаридов в указанной Fc-области являются бисекционными благодаря GlcNAc.
11. Антитело по п.9 или 10, в котором по меньшей мере от примерно 20 до примерно 50% N-связанных олигосахаридов в указанной Fc-области являются бисекционными и нефукозилированными.
12. Антитело по любому из пп.1-11, где указанное антитело обладает повышенной эффекторной функцией и/или повышенной аффинностью связывания с Fc-рецептором.
13. Антитело по п.12, где указанная повышенная эффекторная функция представляет собой повышенную ADCC.
14. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела по любому из пп.1-13.
15. Композиция для экспрессии тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела по любому из пп.1-13, содержащая первый выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 267, и второй выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 265.
16. Вектор для экспрессии тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, содержащий полинуклеотид по п.14.
17. Клетка-хозяин для получения антитела, которое специфически связывается с FAP по любому из пп.1-13, содержащая полинуклеотид по п.14, композицию по п.15 или вектор по п.16.
18. Клетка-хозяин по п.17, где указанная клетка-хозяин дополнительно включает один или более полинуклеотидов, содержащих последовательность, которая кодирует полипептид, обладающий активностью β -(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII).
19. Клетка-хозяин по п.18, где указанный полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII и домен локализации маннозидазы II (ManII) в комплексе Гольджи.
20. Клетка-хозяин по п.18 или 19, где указанная клетка-хозяин дополнительно включает полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид, обладающий маннозидазной II ManII-активностью.
21. Способ получения антитела, которое специфически связывает FAP по любому из пп.1-13, где указанный способ включает:
 - а) культивирование клетки-хозяина по п.17 в среде и в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела, и
 - б) выделение антитела.
22. Способ получения антитела, которое специфически связывает FAP по любому из пп.1-13, где указанный способ включает:
 - а) культивирование клетки-хозяина по любому из пп.18-20 в среде и в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела, и модификацию олигосахаридов, присутствующих в Fc-области антитела, с помощью полипептида, который обладает GnTIII-активностью, и
 - б) выделение антитела.
23. Антитело, которое специфически связывается с FAP, где указанное антитело получают способом по п.21 или 22.
24. Конъюгат антитела для лечения рака, содержащий антитело по одному из пп.1-13 и цитотокси-

ческий агент.

25. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP, содержащая антитело по любому из пп.1-13 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, содержащая также противораковое средство.

27. Применение антитела по любому из пп.1-13 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания, отличающегося экспрессией FAP.

28. Применение п.27, где указанное заболевание представляет собой рак.

29. Применение антитела по любому из пп.1-13 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для индукции лизиса опухолевой клетки.

30. Применение антитела по любому из пп.1-13 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для индукции лизиса стромальной клетки опухоли.

31. Применение по п.29 или 30, где индуцируемый антителом лизис клеток зависит от цитотоксичности антитела.

32. Способ лечения индивидуума, страдающего заболеванием, которое отличается экспрессией FAP, включающий введение индивидууму в эффективном количестве антитела по одному из пп.1-13 или фармацевтической композиции по п.25 или 26.

33. Способ по п.32, в котором индивидууму вводят также дополнительное лекарственное средство, где это дополнительное лекарственное средство представляет собой противораковое средство.

34. Способ по п.32 или 33, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

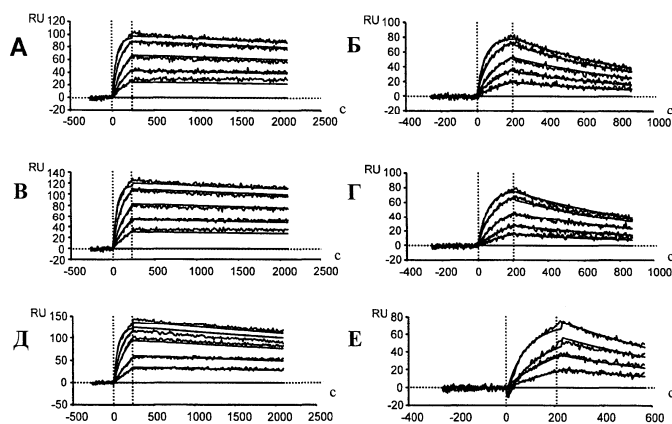
35. Способ индукции клеточного лизиса опухолевой клетки, где указанный способ включает контактирование указанной опухолевой клетки с антителом по любому из пп.1-13.

36. Способ индукции клеточного лизиса стромальной клетки опухоли, где указанный способ включает контактирование указанной стромальной клетки с антителом по любому из пп.1-13.

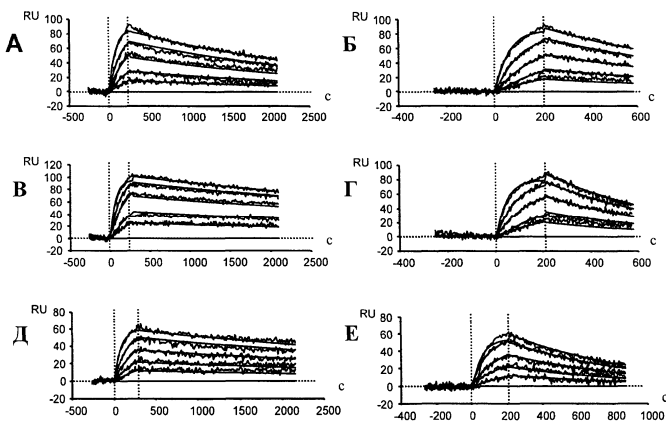
37. Способ по п.35 или 36, в котором указанный клеточный лизис индуцируется антителозависимой цитотоксичностью антитела.

38. Способ диагностирования рака или воспалительного состояния у индивидуума путем определения комплекса диагностического агента и FAP, где указанный способ включает введение индивидууму в эффективном количестве диагностического агента, где

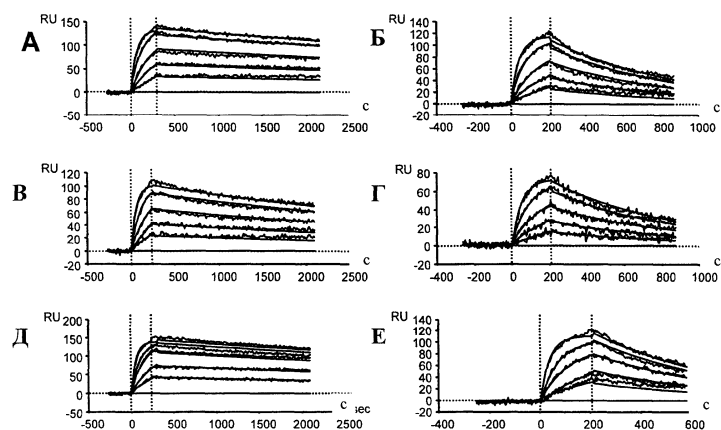
указанный диагностический агент содержит антитело по одному из пп.1-13 и метку, которая позволяет выявлять комплекс, включающий диагностический агент и FAP.



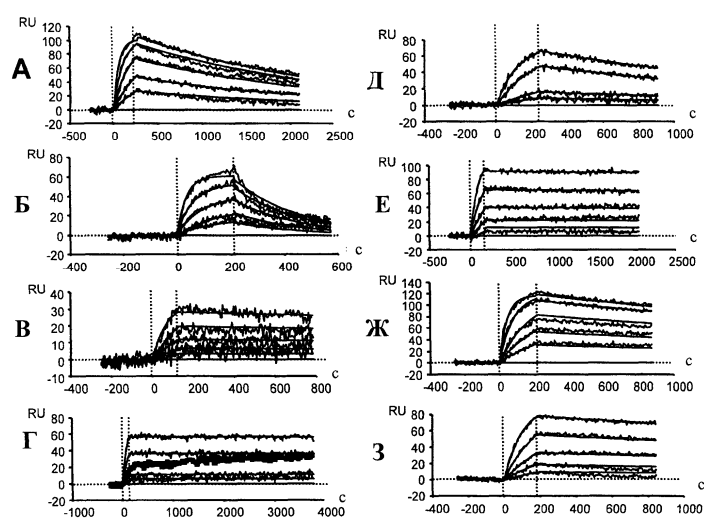
Фиг. 1



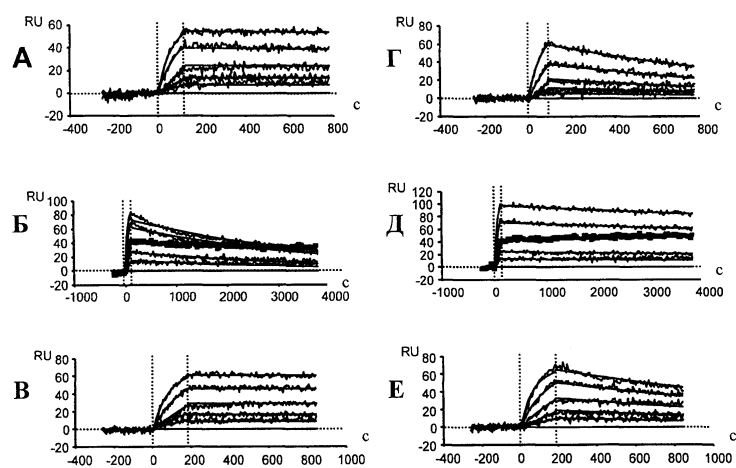
Фиг. 2



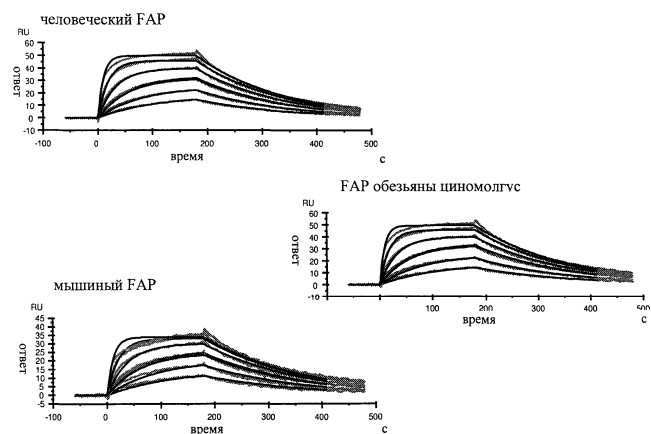
Фиг. 3



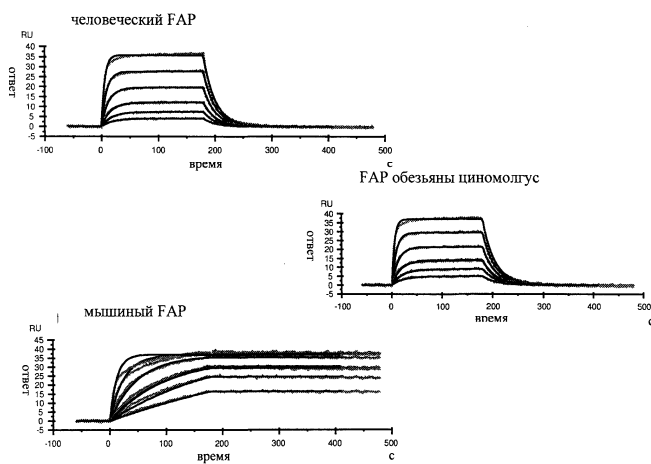
Фиг. 4



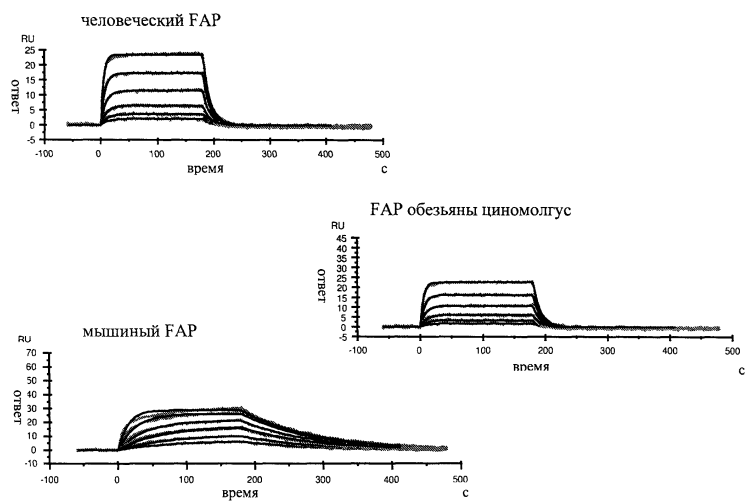
Фиг. 5



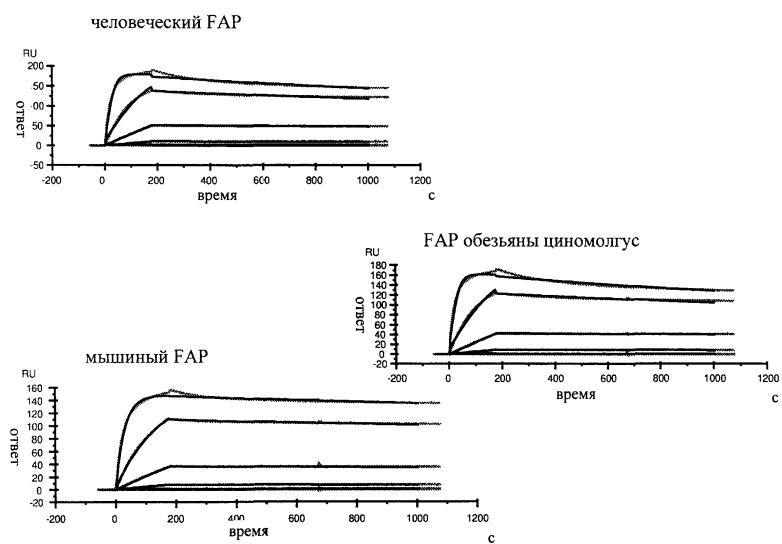
Фиг. 6А



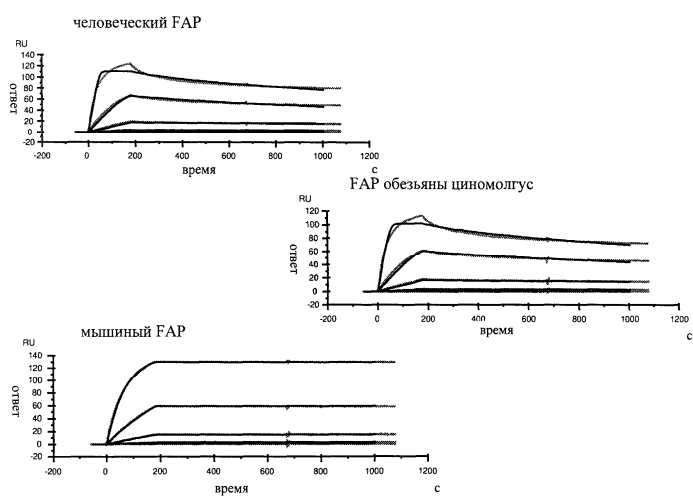
Фиг. 6Б



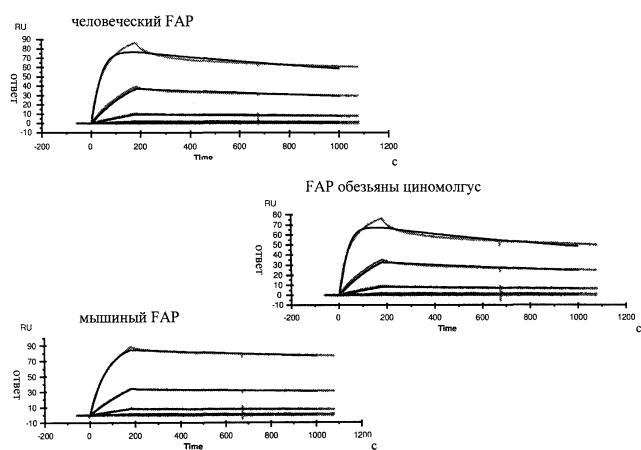
Фиг. 6В



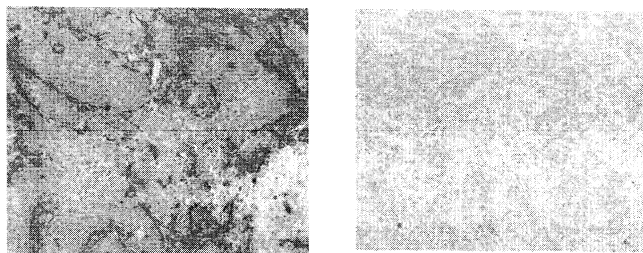
Фиг. 7А



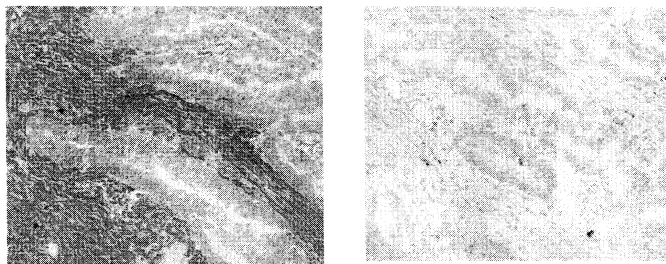
Фиг. 7Б



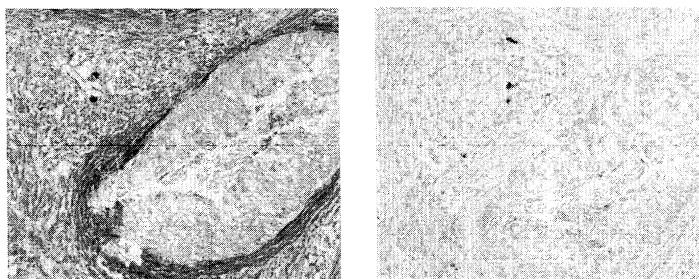
Фиг. 7В



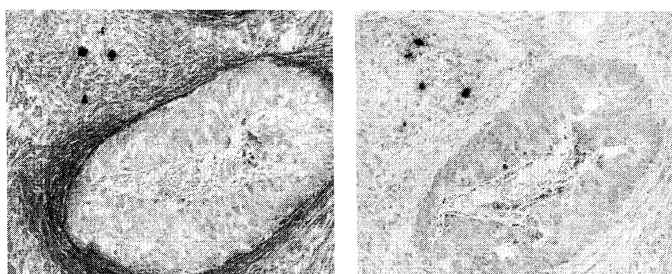
Фиг. 8А



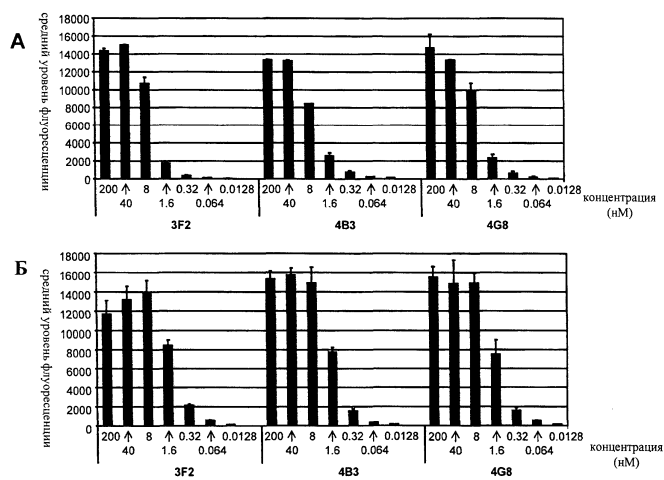
Фиг. 8Б



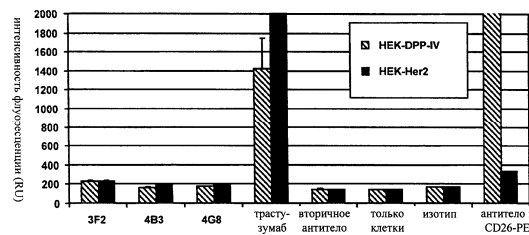
Фиг. 8В



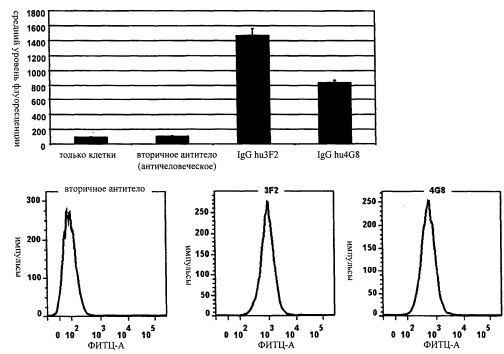
Фиг. 8Г



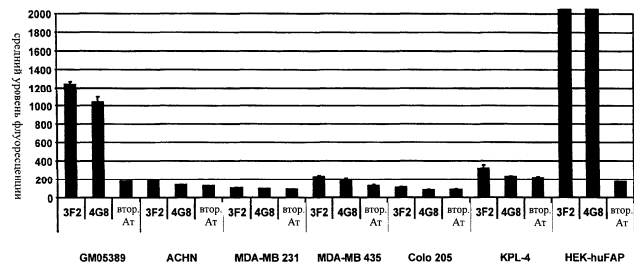
Фиг. 9



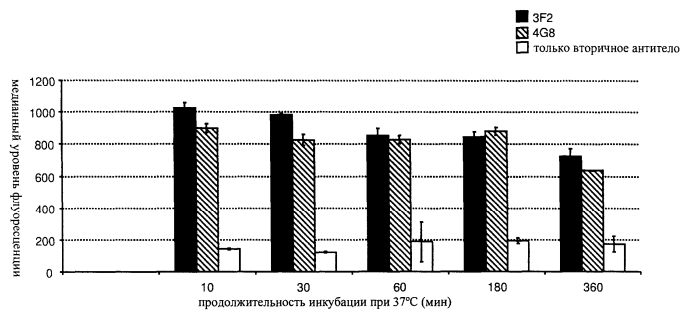
Фиг. 10



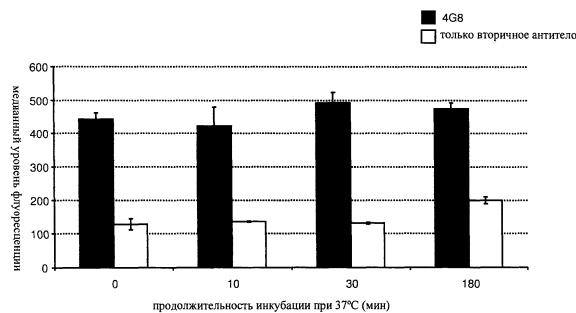
Фиг. 11



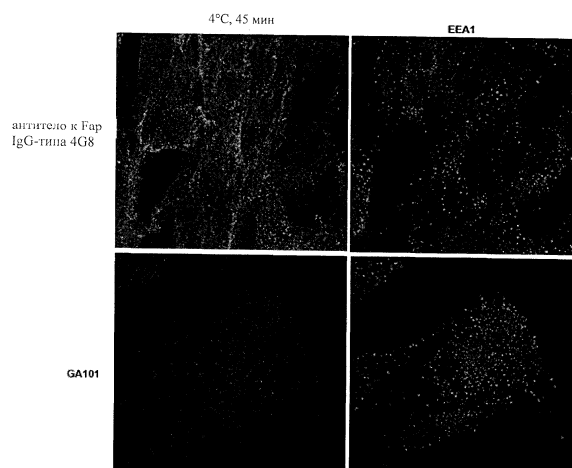
Фиг. 12



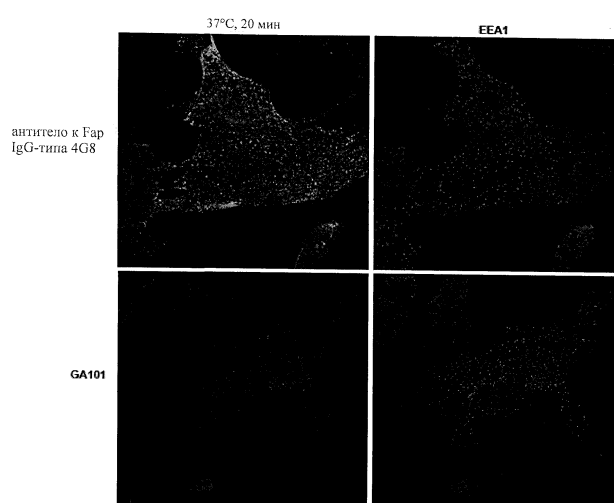
Фиг. 13А



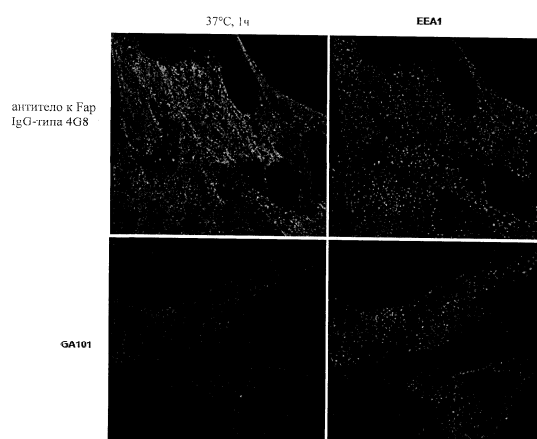
Фиг. 13Б



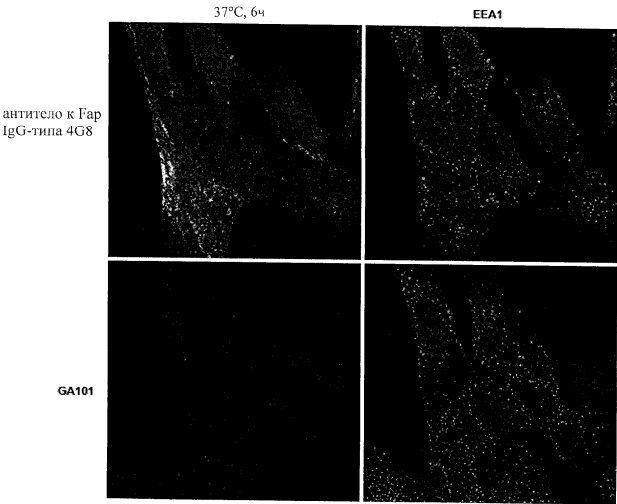
Фиг. 14А



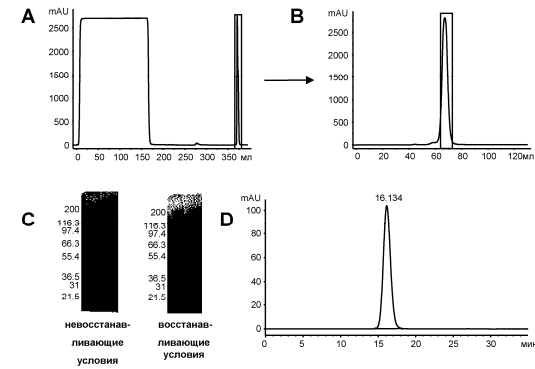
Фиг. 14Б



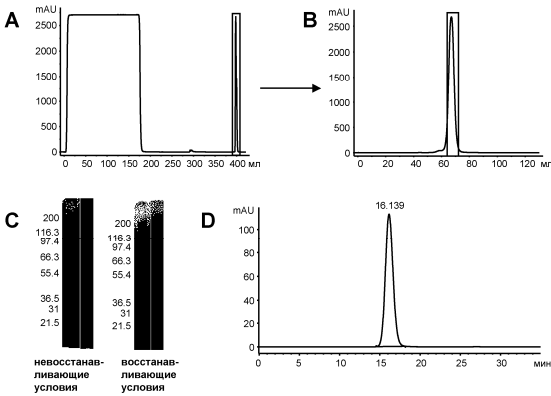
Фиг. 14В



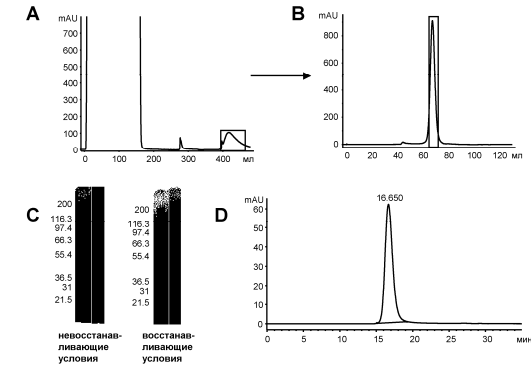
Фиг. 14Г



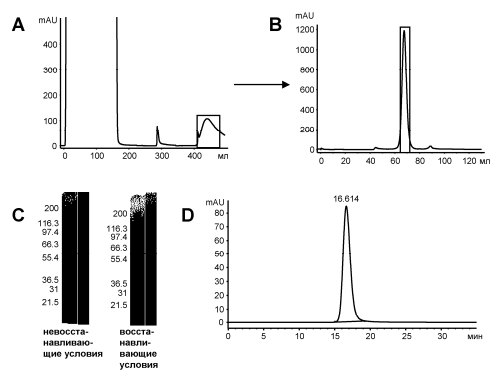
Фиг. 15



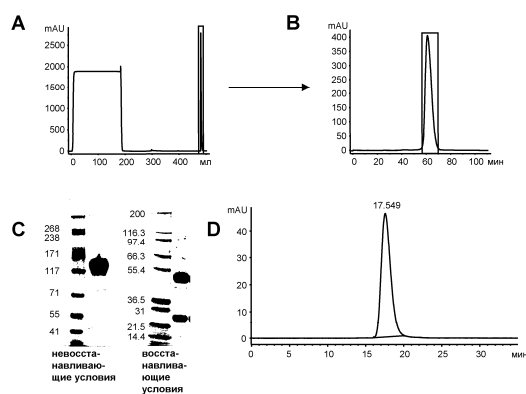
Фиг. 16



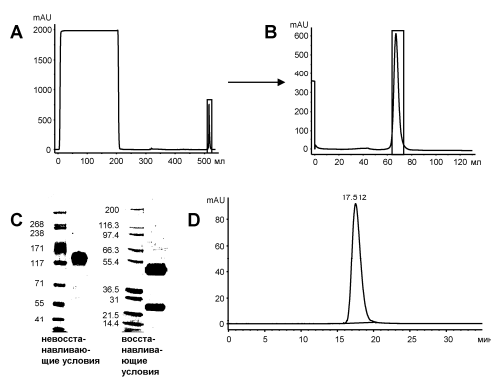
Фиг. 17



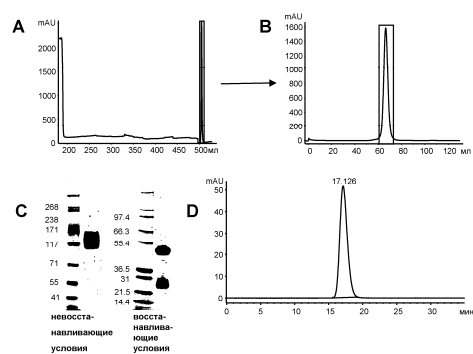
Фиг. 18



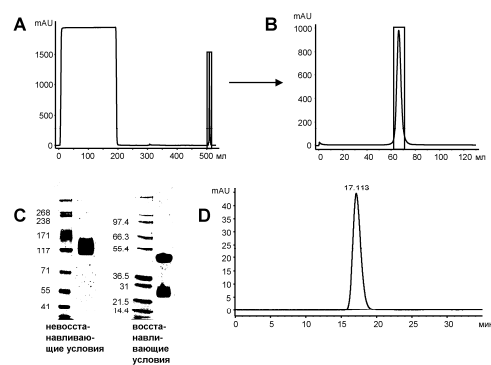
Фиг. 19



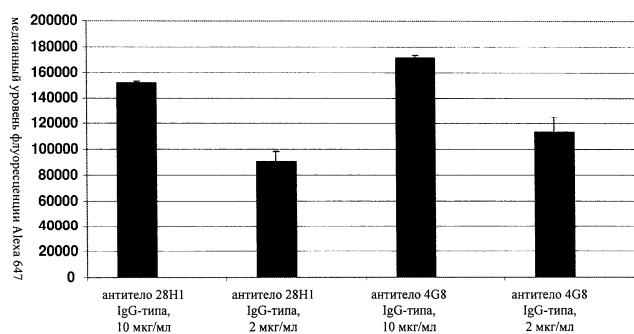
Фиг. 20



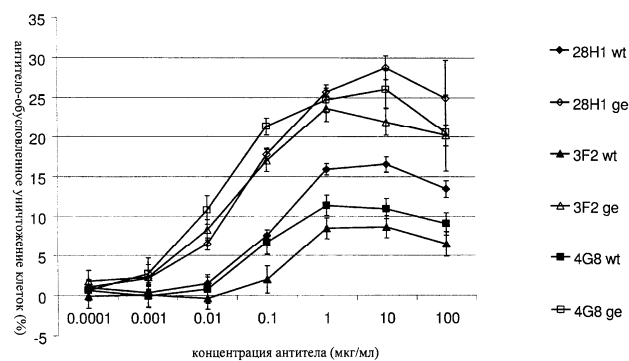
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

